



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

STANOVENÍ VYBRANÝCH LÉČIV VE VODÁCH

DETERMINATION OF SELECTED DRUGS IN WATER

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Tiep Tran Xuan

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1471/2018
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: Tiep Tran Xuan
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
Akademický rok: 2018/19

Název bakalářské práce:

Stanovení vybraných léčiv ve vodách

Zadání bakalářské práce:

1. Zpracování rešerše na dané téma
2. Výběr analytů pro následné stanovení
3. Zpracování metodiky pro odběr vzorků i pro jejich stanovení
4. Zpracování získaných výsledků a jejich interpretace

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Tiep Tran Xuan
student(ka)

prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

ABSTRAKT

Předložená práce se zabývá stanovením různých antibiotik v odpadních vodách. Konkrétně se jedná o trimethoprim, azithromycin a clarithromycin. Ve všech případech se jedná o nežádoucí kontaminaci odpadních vod, která představuje ekologický problém pro životní prostředí. Pro izolaci vybraných léčiv byla po konzultaci s vedoucím práce zvolena metoda extrakce tuhou fází (SPE). Stanovení léčiv proběhlo následně vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s detekcí pomocí hmotnostního spektrometru. Při zachování všech nezbytných postupů byl sledován a následně interpretován dvanáctidenní odtok a přítok na ČOV Brno-Modřice.

ABSTRACT

Submitted thesis tackles the problem of numerous of antibiotics in waste water. Specifically, trimethoprim azithromycin and clarithromycin. In all of those cases we are dealing with a massive ecological threat at hand, causing harm to the enviroment. To isolation the specific kind of antibiotics the method of SPE was chosen by prior consultation with the supervisor. The method of high performance liquid chromatography with mass spectrometry detection was deemed superior for the pinpointing of the exact pharmaceuticals in waste watters. The waste waters in and out flow was observed for twelve days with the maintainance of all necessary procedures listed above at water treatment plants Brno-Modřice.

KLÍČOVÁ SLOVA

antibiotika, trimethoprim, azithromycin, clarithromycin, odpadní vody, rezistence, extrakce tuhou fází (SPE), kapalinová chromatografie (HPLC), hmotnostní spektrometrie

KEYWORDS

antibiotics, trimethoprim, azithromycin, clarithromycin, wastewater, resistance, solid phase extraction (SPE), high performance liquid chromatography (HPLC), mass spectrometry

TRAN XUAN, Tiep. Stanovení vybraných léčiv ve vodách. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/116133>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Milada Vávrová.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych na tomto místě poděkoval paní prof. RNDr. Miladě Vávrové, CSc. za odborné vedení a cenné rady. Dále bych také chtěl poděkovat Ing. Pavlíně Landové za její vstřícnou pomoc a rady při vypracování této bakalářské práce.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Léčiva.....	8
2.1.1	Definice léčiv	8
2.1.2	Základní pojmy.....	8
2.2	Antibiotika.....	9
2.2.1	Historie antibiotik.....	10
2.2.2	Rozdělení antibiotik.....	10
2.2.3	Vedlejší účinky.....	12
2.2.4	Rezistence.....	12
2.2.5	Farmakokinetika antibiotik	13
2.3	Působení léčiv na lidský organismus	14
2.3.1	Buněčný transport antibiotik.....	14
2.3.2	Eliminace farmak z lidského těla.....	15
2.4	Cyklus léčiv v přírodě	16
2.4.1	Odstraňování léčiv v čistírnách odpadních vod	17
2.5	Chemoterapeutika.....	18
2.5.1	Trimethoprim.....	18
2.6	Makrolidová antibiotika	19
2.6.1	Azithromycin.....	19
2.6.2	Clarithromycin.....	20
2.7	Metody stanovení léčiv ve vodách.....	21
2.7.1	Odběry vzorků.....	21
2.7.2	Úprava vzorku odpadní vody.....	22
2.7.3	Extrakce pevnou fází (SPE).....	22
2.8	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	23
2.9	Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie	25
2.9.1	Běžně používané detektory v HPLC/UHPLC	25
3	Experimentální část	27
3.1	Přístroje a využitá zařízení	27
3.2	Software použitý ke zpracování dat.....	27
3.3	Použité chemikálie a standardy.....	27
3.4	Standardy.....	28
3.5	Analyzované matrice	28

3.6	Sledované analyty.....	28
3.7	Postup stanovení.....	28
3.7.1	Odběr vzorků.....	28
3.7.2	Příprava vzorků	28
3.7.3	Přečištění a zakoncentrování vzorku pomocí metody SPE	29
3.7.4	Identifikace a kvantifikace analytu	31
3.7.5	Podmínky měření.....	31
4	Výsledky a diskuze.....	33
4.1	Optimalizace chromatografických podmínek	33
4.2	Optimalizace parametrů MS	33
4.3	Výsledná metoda HPLC/MS	33
4.4	Vyhodnocení dat.....	33
4.5	Chromatogramy a hmotnosní spektra	35
4.6	Reálné vzorky.....	41
4.7	Účinnost odstranění léčiv z odpadní vody	46
4.8	Porovnání se zahraničními údaji.....	51
5	Závěr	53
6	Reference.....	55
7	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	62

1 ÚVOD

Od objevu penicilinu v roce 1928 a následného rozvoje výroby antibiotik v padesátých letech, začaly tyto biologicky aktivní látky představovat zátěž pro životní prostředí. Pomineme-li možnost zvyšování rezistence bakterií a tím tvorbu „superbakterií“, představují tato léčiva nebezpečí pro jednotlivé organismy žijících ve vodách, kam jsou po procesu čištění vypouštěny z ČOV odpadní vody. V rámci fyziologických procesů v lidském těle je nemalá část léčiva vyloučena a následně formou splaškových vod putuje do přírody z důvodu nedostatečného odstranění v ČOV.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Léčiva

Tato kapitola se zabývá kvalifikací a využíváním léčiv v moderní medicíně. Dále jsou zde zmíněny možné dopady jejich využívání.

2.1.1 Definice léčiv

Léčivá látka je běžně označována jako účinná složka léčivého přípravku. Zpravidla se jedná o chemicky čisté látky s přesně definovanou strukturou. V některých případech se může vyskytovat i jako směs složitých chemických substancí. Svůj původ mají jak syntetický, tak přírodního charakteru. Každý stát má přesnou definici pro léčivé látky zakotvenou v legislativě. Pro Českou republiku je to definováno v zákoně č. 378/2007 Sb. [1]. Podle tohoto zákona jsou tyto *léčivé látky* nazývány léčiva nebo farmaka. Legislativa reguluje trh a současně upravuje pravidla pro jejich užívání. Farmaka by proto měla sloužit k léčbě a zmírnění projevů nemocí [1, 2].

Podle zákona č. 378/ 2007 Sb. se léčivým přípravkem rozumí:

- a) Látka nebo kombinace látek prezentovaná tak, že má léčebné nebo preventivní vlastnosti v případě onemocnění lidí nebo zvířat.
- b) Látka nebo kombinace látek, kterou lze použít u lidí nebo podat lidem, případně použít u zvířat nebo podat zvířatům, a to buď za účelem obnovy, úpravy nebo ovlivnění fyziologických funkcí prostřednictvím farmakologického, imunologického nebo metabolického účinku, nebo za účelem stanovení lékařské diagnózy [2, 3].

2.1.2 Základní pojmy

Léková forma je konkrétní způsob upravení léčiva do formy vhodné pro léčebné použití. Jedná se tak o konkrétní podobu léčivého přípravku, tj. jeho fyzikální, chemickou a tvarovou charakteristiku. Může se pak vyskytovat ve formě např. tablet, čípků nebo krémů. Podle způsobu lékové formy ji můžeme rozdělit na *parenterální* (podávané mimo trávicí trubici), *enterální* (působení přes trávicí ústrojí) a *topickou* (aplikované přes kůži nebo sliznici) [4, 5].

Originální farmaka jsou vyvinuta farmaceutickými firmami, které mají zpravidla ze zákona patentovou ochranu pro své výrobky, pokud o ni zažádají. Za každým novým léčivem stojí mnohaleté úsilí vědců a vysoké finanční náklady. Zpravidla se jedná o částky v řádech miliard. Navíc do konečné ceny je nutné započítat i náklady investované do souběžně neschválených léčiv, které se farmaceutické společnosti nevrátí [5, 6].

Generické léčivo se poprvé objevilo v 70. letech minulého století. V prvním počátku byl hlavní záměr Světové zdravotnické organizace zpřístupnit základní lékové skupiny zejména chudým rozvojovým zemím. Otevřenost trhu a ekonomické důvody umožnily, aby generika rychle pronikla i na

farmaceutické trhy bohatších zemí. Generika jsou kopie původních léčiv, vyráběné jiným výrobcem, než je držitel původního patentu. Z právního hlediska je vše legální, pokud výrobce respektuje dobu pro patentovou ochranu. Na trhu se můžeme setkat zpravidla s jedním originálním léčivem a řadou jeho generických alternativ, které v mnoha případech konkurují originálnímu léčivu cenou [7].

Rezidua léčiv jsou zbytky aktivních látek obsažené původně v léčivech. Farmaceutické přípravky využívané pro humánní a veterinární medicínu představují zátěž pro životní prostředí. Výskyt reziduí léčiv může být sledován právě na čistírnách odpadních vod v odpadní vodě [8].

2.2 Antibiotika

Pojem antibiotikum je obecné označení pro lék, který zpravidla cíleně zabíjí určité mikroorganismy, případně brání jejich množení. Cílem léčby je zpravidla omezit působení škodlivých mikroorganismů a co nejšetněji minimalizovat negativní dopady onemocnění na pacienta. V minulosti byl termín používán pro antimikrobiální látky přírodního původu a pro látky uměle syntetizované se využíval termín chemoterapeutika. Chemoterapeutika syntetického původu byla někdy označována jako antimikrobiální látky. Účinky antibiotik se dělí zejména na inhibici množení mikroorganismů, tj. antibiotika bakteriostatická. Druhou možností jsou baktericidní účinky, kdy jsou dané mikroorganismy přímo usmrcovány. Toto rozdělení nemusí být v některých případech přesné, neboť určité množství bakteriostatických antibiotik je ve větších koncentracích bakteriocidních. Není zde přesně definovaná hranice [8].

Tabulka č. 1 Přehled známých antibiotik [4, 9]

Baktericidní antibiotika	Bakteriostatická antibiotika
peniciliny	makrolidy
aminoglykosidy	sulfonamidy
nitroimidazoly	imidazoly
peptidy	tetracykliny

2.2.1 Historie antibiotik

Objev antibiotik patří podle mnohých vědců k jednomu z nejdůležitějších milníků lidstva. V době před „antibiotické“ se mohla stát i banální zranění smrtelná. Otevřené rány nebo i malinkaté škrábnutí mohlo mít za následek smrt. První zmínky o primitivním využití antibiotického efektu jsou nám známy z území dnešní Číny, a to přibližně 2500 let před naším letopočtem. Staří Číňané využili obvazy napuštěné plesnivým sójovým mlékem k léčbě různých infekcí [10]. Naši předkové využívali některé přírodní látky k léčbě, aniž by znali přesnou podstatu původu onemocnění. S vynálezem mikroskopu se vědcům otevřely nové možnosti studovat do té doby neprobádané oblasti mikrosvěta. Roku 1828 zavedl německý vědec Christin Gottfried Ehrenberg pojem *bakterie*. Vědeckému světu ji prezentoval jako odkaz na jistou podobu prvně pozorovaných bakterií k tyčinkám. Vycházel z původního řeckého slova *bakterion*, který lze přeložit jako tyčinka [11]. Fenomenální objev penicilinu Alexandra Fleminga v roce 1929 otevřel možnosti efektivně zachraňovat miliony lidských životů. Nicméně k masovému nasazení léku došlo až v pozdějších letech [12]. Velkou zásluhu na tom měli německý biochemik Ernst Chain a australský patolog Howard Florey. Jako první dokázali úspěšně izolovat penicilin v požadované kvalitě a vyvinout postup pro průmyslovou výrobu. Průmyslová výroba penicilinu se rozběhla až v roce 1941. Zasáhl tedy i do bojů ve druhé světové válce, kdy dramaticky snížil ztráty spojeneckých vojáků. V roce 1945 obdrželi všichni tři vědci Nobelovu cenu [13]. V dnešní době mají již lékaři možnost předepsat pacientům stovky druhů antibiotik. Všeobecný společenský tlak na rychlé vyléčení banálních onemocnění však vede k jejich nadměrnému využívání a s tím rostoucí rezistenci bakterií [4, 12].

2.2.2 Rozdělení antibiotik

Na obrázku č.1 je prezentováno schéma možných působení antibiotických léčiv.

2.2.2.1 Podle spektra účinku

Antibiotika rozdělujeme podle rozsahu jejich působnosti. Máme antibiotika s úzkým spektrem účinku, kdy působí jen na malý okruh bakteriálních druhů. Druhou možností jsou širokospektrální antibiotika, která působí na větší množství patogenních kmenů bakterií. S rostoucím záběrem se ovšem snižuje jejich efektivita. Mezi úzkospektrální antibiotika můžeme zařadit např. penicilin G, penicilin V nebo antituberkulotika. Příkladem širokospektrálních jsou tetracykliny [4, 8].

2.2.2.2 Podle mechanismu účinku

2.2.2.2.1 Inhibice syntézy buněčné stěny

Velká většina bakterií má na povrchu cytoplazmatické membrány navíc buněčnou stěnu. Jedna z hlavních jejích funkcí je ochrana mikroorganismu před nepříznivými vnějšími podmínkami. Je proto naprosto nezbytná pro přežití bakterie. Lékaři využívají právě chybějící buněčné stěny u lidských buněk k cílené inhibici některých z komponent buněčné stěny. Děje se tak za účelem porušení její funkčnosti a způsobení lýze bakterie. Nejčastěji dochází k inhibici enzymu peptidyltransferázy [4, 9].

2.2.2.2.2 Poškození funkce cytoplazmatické membrány

Základem léků založených na poškození funkce cytoplazmatické membrány je porušit její integritu. Následkem bývá únik endogenních látek extracelulárně, zpravidla následuje úhyn mikroorganismu. Porušení integrity je možné vyvolat několika způsoby. Nejčastěji se využívá narušení iontové rovnováhy nebo umělé zvýšení permeability buněčné membrány. Farmaka mají zpravidla lipofilní a hydrofilní složku. Po průchodu buněčnou stěnou se snaží připojit na lipofilní část membrány. Za pomoci navázané molekuly vody ke své hydrofilní části působí destruktivně zevně bakterie a přispívají k jejímu zhroucení [4, 9].

2.2.2.2.3 Inhibice syntézy bílkovin

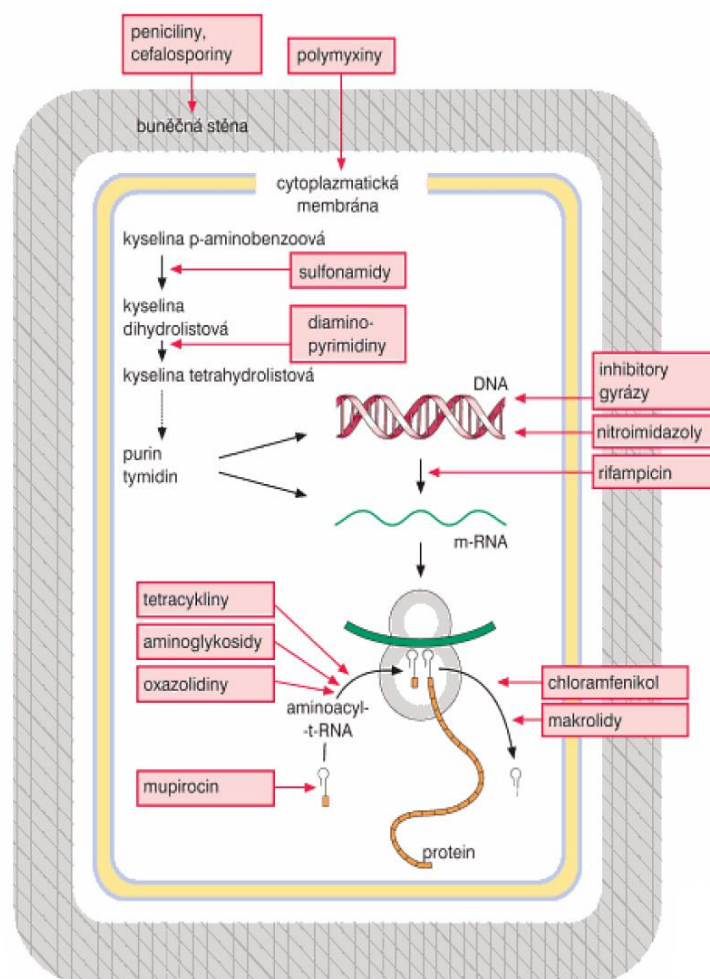
Tyto druhy antibiotik využívají selektivní inhibici syntézy bílkovin u bakterií. Bakteriální bílkoviny jsou běžně syntetizovány ribozomy 70S. Je tak ovlivněn proces syntézy bílkovin, který je nezbytný pro přežití všech organismů. Proces elongace peptidového řetězce je napaden a není mu umožněno standardního chování [4, 9].

2.2.2.2.4 Inhibice syntézy nukleových kyselin

Jedná se o inhibitory RNA polymerázy. Může se jednat o inhibici mRNA. Druhou možností je inhibice samotné DNA syntézy [4, 9].

2.2.2.3 Podle typu účinku

V případě, že léčivé látky usmrcují infekční mikroorganismy, hovoříme o *baktericidních* antibiotikách. Omezí-li se léčivo na inhibici růstu a množení mikroorganismů, označujeme je jako *bakteriostatické* antibiotikum. V některých případech mohou mít vysoké dávky bakteriostatických antibiotik rovněž baktericidní účinky [4, 9].



Obrázek č. 1 Mechanismus působení antibiotických léčiv [8]

2.2.3 Vedlejší účinky

Jako všechna léčiva mají i antibiotika vedlejší a nežádoucí účinky. Ačkoliv při léčbě pacienta převažují kladné vlastnosti těchto antibiotik, nelze opomenout i jejich negativní (toxické) vlastnosti. Při procesu léčby pacienta může docházet např. k poškození ledvin, jater a gastrointestinálního traktu. V samotné lidské buňce může docházet k ovlivnění funkce mitochondrií a způsobit tak bioenergetickou krizi. Může docházet i k narušení proteosyntézy. Důsledkem podání léčiva může být přímé ohrožení pacientova života. V ojedinělých případech může dojít k prudké alergické reakci i k anafylaktickému šoku. Proto se třeba také v případě penicilinu testují možné alergické reakce ještě před samotným podáním [14, 15].

2.2.4 Rezistence

Antibiotika patří v dnešní době k nejčastěji používaným léčivům vůbec. Tento přístup sebou nese negativní důsledky a ohrožuje možné budoucí možnosti léčby dnes zdánlivě banálních onemocnění.

Následkem nadměrného užívání antibiotik dochází k rozvoji rezistentních kmenů bakterií. Nezřídka se stává, že se špatně informovaný laik snaží léčit antibiotiky různá virová onemocnění. Podle definice je *rezistence* schopnost bakteriální populace odolat příslušným antibiotikům. Je úzce spjata se špatnou hygienou a nadužíváním dezinfekce [16, 17]. V současnosti je stále složitější vyvinout nový druh antibiotik. Vědecká komunita se domnívá, že reálně existuje možnost konce efektivity antibiotik v důsledku zvýšené rezistence. Každý rok zemře v zemích Evropské Unie až 25 000 lidí na choroby spojené s rezistencí. Hrozba „post-antibiotické éry“ může tak nastat v brzké budoucnosti [18]. V historickém kontextu můžeme uvést příklad makrolidových antibiotik, kdy jejich vysoká spotřeba vedla v Japonsku v roce 1974 ke zvýšení rezistence streptokoků A pro erytromycin v 62 % případů, při 22% podílu spotřeby těchto antibiotik. Po poklesu spotřeby na 8 % v roce 1988 klesla rezistence na pouhých 2 % [19]. Velkým problémem je rovněž preventivní používání antibiotik při chovu hospodářských zvířat. Zemědělci v honbě za zvýšeným ziskem přidávají do krmiva antibiotika pro snížení rizika nemoci zvířete. Tato léčiva se po porážce zvířete mohou dostávat do lidského organismu [20].

2.2.4.1 Primární rezistence

Je definovaná jako přirozená odolnost mikroorganismů, která je dána geneticky. Není proto vyžadován předchozí kontakt bakterie s antibiotikem [17].

2.2.4.2 Sekundární rezistence

Tento druh rezistence je možné získat následkem selekčního tlaku prostředí, nebo důsledkem mutace samotného bakteriálního genomu. Byl pozorován i přenos rezistentního genu napříč bakteriemi stejného druhu. Samotná bakterie si tak může vyvinout antibiotickou rezistenci i bez kontaktu s daným druhem antibiotika [17].

2.2.4.3 Zkřížená rezistence

Bakterie si mohou vypěstovat i rezistenci na antibiotika, která jsou si chemicky podobná. Jako příklad můžeme uvést skupinu antibiotik sulfonamidů. V případě zisku rezistence na jakýkoliv druh léčiva této skupiny má za následek zisk rezistence na všechna farmaka ve skupině [17].

2.2.4.4 Rezistence sdružená

Definujeme ji jako schopnost mikroorganismu být odolný vůči chemicky odlišným druhům antibiotik [17].

2.2.5 Farmakokinetika antibiotik

Farmakokinetické vlastnosti daného antibiotika určují způsob aplikace a dávkování. Vysvětlují cestu podání, jednotlivé dávky, dávkovací interval a délku podávání. V případě antibiotických léků jsou

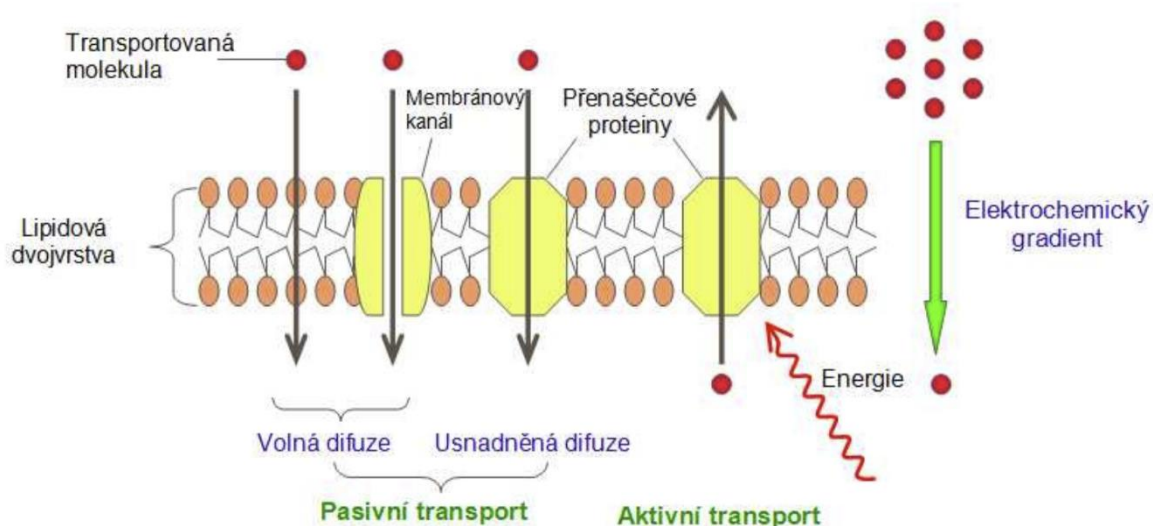
preferované způsoby buď perorální, případně intravenózní. Důležitým údajem je rovněž *biodostupnost*, která nám vyjadřuje procento léku, které je systémově dostupné. V případě perorálního podání léku pacientovi není možné docílit okamžitého účinku léčiva. Je to z důvodu zjevných překážek, které musí léčiva překonat, než vstoupí do krevního řečiště. Citelné ztráty jsou již způsobeny nutností průchodu samotným gastrointestinálním traktem (GIT). Nekonstantní podmínky v různých částech gastrointestinálního traktu zapříčiní snížení účinnosti samotného léčiva. Například v případě penicilinu V je zachována biodostupnost po průchodu žaludkem jen mezi (60–70 %). Dalším klíčovým faktorem je zpomalený léčebný efekt. V akutních případech, kdy je třeba začít s léčbou co nejdříve, je preferováno, pokud je to možné, intravenózní podání léčiva. V takovém případě dosahuje biodostupnost maximální úrovně [21, 22].

2.3 Působení léčiv na lidský organismus

Díky velkému cévnímu zásobení a výskytu hepatocytů, jakožto buňky zodpovědné za většinu metabolických pochodů probíhajících v lidském těle, jsou přirozeným místem pro metabolismus jícna. Při metabolické přeměně vznikají odpadní látky a tyto metabolity je nutné z lidského těla vyloučit. Tato činnost je nezbytná pro zachování zdraví člověka, neboť některé metabolity mohou být ve větších koncentracích toxické [23].

2.3.1 Buněčný transport antibiotik

Při transportu léčiva na úrovni buňky je nutné zajistit přestup přes fosfolipidovou vrstvu membrány. Známe několik možností pronikání látek přes cytoplazmatickou membránu. Nejčastěji se jedná o pasivní *difúzi* neboli pasivní transport. Druhou možností je aktivní transport. Při difúzi není třeba vynakládat žádnou energii. Vše se děje na základě rozdílnosti koncentrace léčiva na obou stranách membrány a pomocí koncentračního gradientu je hnáno léčivo dovnitř buňky. Při aktivním transportu je naopak vyžadována energie. Je třeba takzvaných *membránových přenašečů*, které umožní transport v podobě léčivo-přenašeč. Po průchodu se tento komplex běžně rozpadá. Přenos je v tomto případě většinou proti koncentračnímu gradientu. Na obrázku č. 2 je znázorněno schéma přenosu látek přes plazmatickou membránu [4, 8, 22].

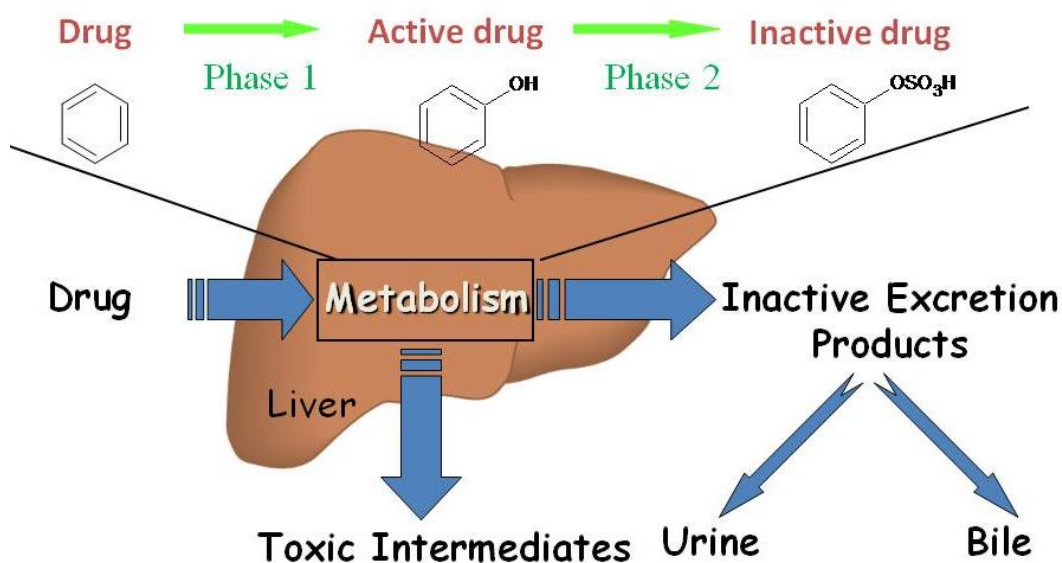


Obrázek č. 2 Přenos přes plazmatickou membránu [24]

2.3.2 Eliminace farmak z lidského těla

Samotná antibiotika mohou být vyloučena z lidského organismu buď ve formě metabolitů, případně v nezměněné podobě. Děje se tak převážně dvěma způsoby, a to vyloučením pomocí stolice nebo močí. V menším množství je možné vyloučit léčiva žlučí, potom, případně dechem. Eliminací nevyjadřujeme jen pouhé vyloučení antibiotik z lidského organismu; eliminací je i metabolická inaktivace léčiva v metabolických dějích. Pro ireverzibilní vyloučení léčiva z organismu je nejdůležitější takzvaná renální exkrece. Zahrnuje glomerulární filtraci, pasivní zpětnou difuzi, aktivní tubulární sekreci a aktivní tubulární reabsorpci. Další možností je biliární exkrece, kdy dochází k metabolické přeměně v tomto pořadí; játra, žluč, střevo. Exkrece plícemi podléhají všechny prchavé látky bez ohledu na původ [25]. S eliminací léčiv pomáhají zejména játra a ledviny. Na obrázku č. 3 je schéma průchodu léčiva játry. Protože metabolický enzymatický systém je při narození pouze částečně vyvinut, novorozenci mohou mít problémy metabolizovat určitá farmaka. S přibývajícím věkem se enzymatická aktivita obvykle snižuje. Staří lidé a novorozenci proto nemohou metabolizovat léky tak dobře jako zbytek populace, a proto je jim doporučeno podávat menší množství léčiva, zásadně vztaženého na jejich hmotnost [9, 26].

Drug Metabolism



Obrázek č. 3 Diagram metabolismu léčiva [27]

2.4 Cyklus léčiv v přírodě

Výskyt léčiv v životním prostředí představuje ekologickou zátěž, která získává na důležitosti v posledních letech. Po dokončení metabolických procesů v organismu je nejčastější formou vyloučení reziduí léčiv v podobě moči a stolice. Při optimální situaci putují dále do kanalizace a končí v čistírně odpadních vod (ČOV), které mají za úkol odpadní vody zneškodnit v souladu s platnými předpisy. Tato upravená voda je následně vypouštěna do životního prostředí. Ve vyspělých zemích je běžně kanalizační síť napojená na čistírny odpadních vod, avšak v případě mnoha chudších zemích světa jsou odpady mnohdy vypouštěny přímo do řek. Tyto vodní toky jsou následně přenašečem znečištění a samotná kontaminace toxinů může být životu nebezpečná. V případě velkých toků, jako je třeba řeka Ganga v Indii, mají tyto skutečnosti dopad na stovky milionu lidí [16, 28, 29]. I v použití čistírny odpadních vod není zaručeno úplné odstranění léčiv z odpadních vod. Výsledky mnohých výzkumů již dospěly k závěrům, že proces odstranění antibiotik je omezený až nedostatečný. I takto částečně vyčištěná odpadní voda může kontaminovat vodní toky, zásobárny podzemních vod, dostávat se do těl živočichů a tím ovlivnit celý potravní řetězec [30]. Nejsou to však jen humánní antibiotika, která představují ekologickou hrozbu. Veterinární léčiva používaná pro léčbu nemocných hospodářských zvířat se mohou skrze jejich výkaly dostat do hnojiva aplikovaného na polích. V případě blízkosti polí k vodním zdrojům může dojít k následné kontaminaci. Dalším významným znečišťovatelem jsou rybí farmy, kde se mnohdy do krmení přidávají antibiotika jako preventivní opatření proti nemocem ryb. Můžeme uvést

například Chile, kde bylo v roce 2015 použito 557 tun antibiotik na přímořský chov 883 tun lososa. Tento způsob chovu je již prostřednictvím právních předpisů regulován v mnoha zemích [31]. Mezi významné znečišťovatele počítáme rovněž zdravotnická zařízení a továrny produkující léky. U těchto zařízení je nezbytné zajistit chemickou předúpravu odpadních vod. Probíhá tak za součinnosti například filtrů z aktivního uhlí, membránové filtrace, pokročilých oxidačních procesů nebo ozonizací vody [32, 33].

2.4.1 Odstraňování léčiv v čistírnách odpadních vod

Nejčastějším typem pro čištění odpadních vod je mechanicko-biologické čištění s chemickým dočišťováním [33]. Postupy k čištění odpadních vod ovlivňují samotnou účinnost odstranění reziduí léčiv. Většina léčiv není však při stávajících postupech odstraněna, případně účinnost čištění není tak velká. Dochází proto k paradoxní situaci, kdy je samotná čistírna odpadních vod znečišťovatelem životního prostředí.

Samotný proces přečištění odpadních vod je rozdělen do tří částí. Primární fáze čištění odstraňuje hrubé nečistoty, které by mohly poškodit pozdější zařízení využívané v další fázi čištění. Veškerý písek, odpadky atd. je odstraněn spolu s oleji a tuky. Sekundární část má za úkol odstranit biologickou hmotu z odpadních vod. Využívá se přitom technologie biochemických procesů s účastí vhodných mikroorganismů. Čistírny odpadních vod operují v této fázi s *aktivovaným kalem*. Tyto mikroorganismy (bakterie) rozkládají organické látky obsažené v odpadní vodě. Jsou rovněž nasazovány houby, plísně, případně kvasinky a další. Hovoříme proto o procesu biotickém, tj. degradaci léčiva pomocí bakterií a plísní. Probíhá rovněž proces abiotický (sorpce, hydrolýza, případně fotolýza) [33–36]. V případě antibiotik bylo zjištěno, že představují závažný problém pro sekundární část čištění, kdy dochází do kontaktu s mikroorganismy aktivovaného kalu, které v tomto případě považujeme za „prospěšné“. Snižují však samotnou účinnost procesu čištění. Nepochopitelně, lipofilní antibiotika mají tendenci přecházet do organicky bohatého kalu. Opačným směrem putují polární antibiotika, která mají tendenci pokračovat až do vyčištěné vody. Kalová sorpční konstanta K_d vyjadřuje schopnost léčiva přecházet do kalu. Čím jsou větší hodnoty K_d , tím dochází k větší sorpci. Kal lze v některých případech používat jako hnojivo. Není to však z hygienických důvodů doporučováno, neboť do kalu přechází velké množství polutantů, včetně antibiotik a těžkých kovů. Další parametr, který můžeme využít, je koeficient oktanol – voda K_{ow} . Udává nám míru schopnosti léčiva přecházet do kalu, případně jeho setrvání ve vodě. Čím větší je hodnota $\log K_{ow}$, tím je zpravidla větší sorpční schopnost. Převážná část léčiv má hydrofilní vlastnosti, a proto zůstávají ve větší míře ve vodném prostředí. Je třeba dbát na správné faktory ovlivňující odstranění léčiv z odpadních vod. Ve velké míře jsou ovlivňovány existencí a velikostí anoxických a anaerobních procesů, teplotou a pH [33, 36]. Terciární proces čištění je založen na odstraňování fosforu síranem železitým [35]. V důsledku tlaku ekologických hnutí jsou postupně přijímány postupy pro dokonalejší odstraňování nežádoucích látek z odpadních vod. V případě

zbytkových antibiotik se jedná o problém rezistence a možné intoxikace živočichů v životním prostředí. Bohužel, hlavní překážkou realizace v masovějším měřítku mohou být ekonomické problémy [37].

2.5 Chemoterapeutika

Zpravidla se jedná o léky užívané k léčbě infekcí, zejména bakteriálních nebo protozoárních. Definujeme je jako látky čistě chemického původu. Nejčastěji se užívají sulfonamidy [38].

2.5.1 Trimethoprim

Trimethoprim je pyrimidinový analog, který narušuje syntézu folátu (kyseliny listové). Folát je esenciální částí syntézy thymidinu. Trimethoprim inhibicí bakteriálního enzymu fakticky zablokuje syntézu nezbytných nukleotidů pro DNA replikaci. Antibakteriální účinek může být umocněn při současném využití sulfonamidů [39, 40]. Patří do skupiny léčiv nazývaných chemoterapeutika. Tento druh léků svými vlastnostmi a způsobem použití připomínají antibiotika, avšak jsou čistě chemického původu. Využívá se k léčbě původců infekcí: *E. coli*, *Enterobacter*, *Proteus*, stafylokoky a streptokoky [40]. Je předepisován v případech potřeby léčby akutních a chronických infekcí močového ústrojí a ledvin. Je možné ho předepsat i k léčbě infekce trávicího a dýchacího ústrojí. Trimethoprim je nasazován k léčbě dospělých, mladistvých a dětí starších šesti let. Nemá být podáván těhotným ženám, nedonošeným novorozencům ani novorozencům během prvních několika týdnů života. Nejčastějšími nežádoucími účinky při obvyklých dávkách jsou pruritus a kožní vyrážka (přibližně 3–7 % pacientů) a mírné gastrointestinální nežádoucí účinky, včetně nevolnosti [40, 41].

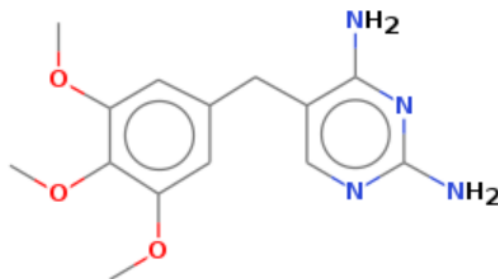
2.5.1.1 Základní informace o Trimethoprimu

Sumární vzorec: $C_{14}H_{18}N_4O_3$, na obrázku č. 4 je chemický vzorec Trimethoprimu

CAS číslo: 738-70-5

Molekulová hmotnost [g.mol⁻¹]: $M_r = 290,32$

Další vlastnosti: Bílá krystalická látka, bez zápachu [39]



Obrázek č. 4 chemický vzorec Trimethoprimu [39]

2.6 Makrolidová antibiotika

Makrolidy jsou od poloviny minulého století hojně užívaným antibiotikem zejména v ambulantní péči. Mají široké spektrum účinnosti, které zahrnuje i atypické původce respiračních infekcí. Velmi kladně je lékaři hodnocen nízký výskyt nežádoucích účinků. Generický název *makrolidů* je odvozením jejich chemické struktury. Jedná se o makrocyclický laktanový kruh s jedním nebo více cukry. K první izolaci představitele této skupiny léčiv došlo již v roce 1952. Makrolid erythromycin byl metabolickým produktem kultur *Streptomyces erythreus*. V současnosti se v klinické praxi používají makrolidy s 14členným laktanovým kruhem (erythromycin a jeho deriváty) nebo se 16členným laktanovým kruhem (josamycin). Mezi novější makrolidy můžeme řadit clarithromycin a azithromycin. V posledních letech byl zaznamenán celosvětový trend vzestupu nasazování právě těchto novějších makrolidů. V přímém srovnání s erythromycinem mají lepší charakteristiky zejména v oblasti farmakokinetiky a nežádoucích účinků. V řadě zemí se nahradily i penicilín z pozice „zlatého standardu“ léčiv pro léčbu streptokokových a pneumokokových infekcí [19]. Všechna makrolidová antibiotika (přirozená i semisyntetická) mají shodný mechanismus účinku. Po prvotním průniku do bakteriální buňky zastavují proteosyntézu blokováním peptidové vazby na 50S subjednotce bakteriálního ribozomu. Buňka tak není schopna syntetizovat potřebný protein a hyne. Jde primárně o bakteriostatické působení. Antimikrobně působí především na grampozitivní mikroby, jakož i na bakterie bez buněčné stěny [42]. Semisyntetické makrolidy mají řadu předností v porovnání s původním erythromycinem. Například můžeme uvést nutnost nižší dávky (poloviční až třetinová) při shodné nebo vyšší účinnosti. Dále jde o méně časté podávání, dobrou snášenlivost organismem a sníženou interferenci s dalšími farmaky. Mezi erythromycinem, clarithromycinem a azithromycinem platí zkřížená rezistence. V klinické praxi to znamená, že pokud neúčinkuje jedno z antibiotik, nemá cenu nasazovat ostatní [42, 43].

2.6.1 Azithromycin

Azithromycin je Azalid odvozený od erythromycinu. Patří do podtřídy makrolidových antibiotik s bakteriostatickými a bakteriocidními účinky. Azithromycin se reverzibilně váže na ribozomy bakterií, čímž inhibuje translační kroky syntézy molekul proteinů. Tím zastavuje buněčný růst a vede k buněčné smrti bakterie [44]. Je často používanou alternativou k erythromycinu při léčbě komunitních a atypických pneumonií, chlamydiových a mykoplasmatických infekcí. Rovněž ho lze použít při přecitlivělosti k penicilinům u nekomplikovaných infekcí měkkých tkání způsobených

S. pyogenes. Azithromycin účinkuje na stejné mikrobiální spektrum jako erythromycin. Je také účinný na atypická *mykobakteria*. Pro svoji specifickou farmakokinetiku bývá často označován jako „inteligentní antibiotikum“. Jeho sérová koncentrace je velmi nízká, zatímco v ložisku zánětu a ve

tkáních je hladina vysoká. Navíc má extrémně dlouhý poločas ($T_{1/2} = 2\text{--}4$ dny), což umožňuje zkrátit dobu jeho podávání. Další výhodou je, že nemá stejná rizika jako erytromycin [9, 45, 46].

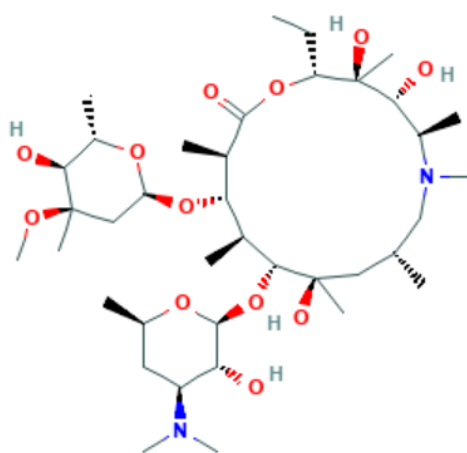
2.6.1.1 Charakteristika Azithromycinu

Sumární vzorec: $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$, na obrázku č. 5 je chemický vzorec Azithromycinu

CAS číslo: 83905-01-5

Molekulová hmotnost $[g \cdot mol^{-1}]$: $M_r = 748.996$ g/mol

Další vlastnosti: Bílá krystalická látka, bez zápachu [44]



Obrázek č. 5 vzorec Azithromycinu [44]

2.6.2 Clarithromycin

Clarithromycin je stabilní v GIT v porovnání se svým předchůdcem erytromycinem. U něho je rovněž zlepšená absorpce léčiva. Léčivo interaguje s bílými krvinkami (fagocyty) a je tak transportováno do ložisek infekce, kde je následně uvolňováno skrze fagocytózu. Clarithromycin inhibuje proteosyntézu u napadených bakterií. Po vstupu do bakterie se naváže na ribozomální podjednotku 50S a zabraňuje translaci pomocí tRNA. Tento efekt má pro bakterii smrtící následky, protože je zablokována peptidyltransferáza, nezbytná pro růst bakterie. Jeho sérová koncentrace je velmi nízká, zatímco ve tkáních a v ložisku zánětu je hladina vysoká. V porovnání s erytromycinem má jak dvojnásobný vylučovací poločas, tak také terapeutickou hodnotu. Jednou ze zajímavostí, které se mohou vyskytnout při užívání Clarithromycinu je to, že při testování se může vyskytnout pozitivně falešný výsledek způsobený přítomností kokainu v moči [47]. Léčivo má pozoruhodné účinky proti kmenům bakterií *M. leprae* (původce lepry) a bakterií rodu *Borrelia* (původce Lymeské boreliózy). Běžně se využívá k léčbě bakteriálních infekcí horních a dolních cest dýchacích, včetně pneumonie. Léčivo se prodává pod obchodním názvem Klacid a jeho generické názvy mohou být Fromilid, Klabax atd. [43, 47, 48].

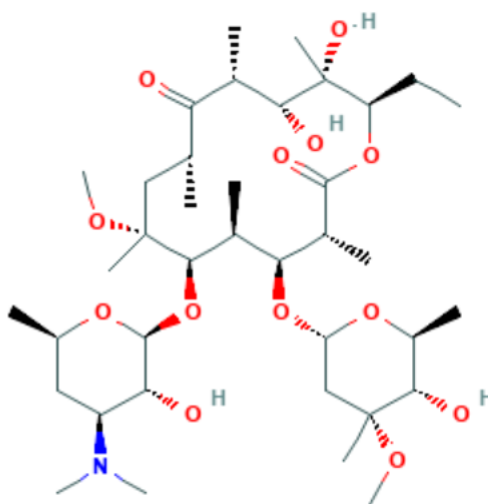
2.6.2.1 Charakteristika Clarithromycinu

Sumární vzorec: $C_{38}H_{69}NO_{13}$, na obrázku č. 6 je chemický vzorec Clarithromycinu

CAS číslo: 81103-11-9

Molekulová hmotnost [$g \cdot mol^{-1}$]: $M_r = 747.953 \text{ g/mol}$

Další vlastnosti: Bílá krystalická látka, bez zápachu, stabilní při kyselém pH [47]



Obrázek č. 6 vzorec Clarithromycinu [47]

2.7 Metody stanovení léčiv ve vodách

Postup pro stanovení léčiva ve vzorcích má tyto hlavní kroky:

- Odběr vzorku
- Úprava vzorku odpadní vody
- Extrakce tuhou fází (SPE)
- Přečištění, finální úprava vzorků, příprava vialky.

2.7.1 Odběry vzorků

Jedná se o jeden z nejdůležitějších kroků majících vliv na správný výsledek celé analýzy. Odběry vzorků se mohou lišit v závislosti na námi sledovaných léčivech. Zpravidla je odebíráno 1–2 litry vody, které následně přepravujeme v tmavých skleněných lahvích. Odebraný vzorek by měl mít dostatečnou vypovídající hodnotu a způsob odběru by měl být po celou dobu komplexního měření zachován.

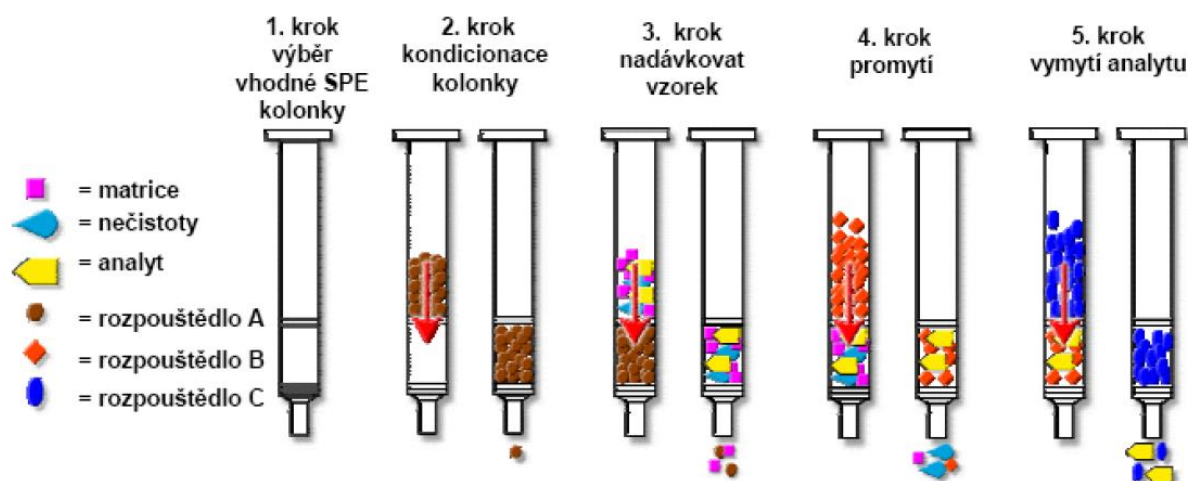
V případě zkoumaných odpadních vod může dojít k jisté nehomogenitě a k celkovým změnám zkoumaných vod v průběhu času. Možným východiskem je vytvoření tzv. směsného vzorku, kdy jsou odebírány individuální vzorky v předem definovaných intervalech z odpadní vody a následně jsou smíchány za daný časový úsek. Získáme tak komplexnější pohled na testované látky v průběhu času. Před samotným vzorkováním je třeba si vyhledat fyzikálně-chemické vlastnosti námi zkoumaného léčiva a podle těchto vlastností případně dodatečně upravit pracovní postup. Skladované vzorky by měly umístěny do chladného a temného místa (nejčastěji lednice) pro zabránění biodegradace. Podle metody EPA 1694 je pro správné vyhodnocení vzorků provést extrakci do 48 hodin od odběru, a proto je možné ji odložit při dodržení dodatečných opatření (zmražením) několik dní, aniž by došlo k degradaci samotného vzorku [3, 36, 49].

2.7.2 Úprava vzorku odpadní vody

Základem každé úpravy vody je přefiltrování, které zajistí odstranění mechanických nečistot, které by mohly ovlivnit pozdější analytické výsledky. K samotné filtraci by mělo dojít co nejdříve po odběru vzorku, a to v zájmu snížení možnosti degradace zkoumaných látek. V případě nemožnosti okamžité úpravy je nutné vzorek uchovávat v chladu a nejlépe bez přístupu světla. V případě delší prodlevy je třeba vzorek zakonzervovat vhodným konzervačním roztokem, který neovlivní námi sledované analyty [49, 50].

2.7.3 Extrakce pevnou fází (SPE)

Vzhledem k tomu, že hladiny léčiv v odpadních vodách jsou většinou příliš nízké, je nemožné aplikovat přímé dávkování vzorků do přístrojů pro detekci (chromatografický systém). Vzorky se proto musí zakonzentrovat na potřebnou koncentraci. V environmentální analýze se v posledních letech začala ve velké míře používat zejména extrakce na pevnou fázi SPE (Solid-phase extraction), která má v porovnání s dříve používanou extrakcí kapalina kapalina LLE (Liquid-liquid) zjevné výhody. Cílem je především, a to při zachování účinnosti, snížit náklady a spotřebu prekoncentračních metod, tj. snížení spotřeb drahých organických rozpouštědel a zabránění problémům s nerozdělením fází [49, 50]. Extrakce tuhou fází rovněž umožňuje automatizaci a přečištění možných dodatečných nečistot. Na trhu je momentálně k dostání řada SPE kolonek lišící se velikostí kolonky a adsorbentu [51].



Obrázek č. 7 Schéma extrakce tuhou fází (SPE) [52]

2.7.3.1 Systém SPE s obrácenými fázemi

Kolonka je naplněna silikagelem, na který se váží organické sloučeniny. Před samotným zahájením extrakce je nutné kolonku *kondicionovat* určitým množstvím rozpouštědla (methanol, 6ml). Následuje aplikace polárního roztoku (mili-Q, 6 ml) s podobnými vlastnostmi jako má vzorek. V žádném případě by nemělo dojít k vyschnutí sorbentu během *kondicionace*, neboť by se mohla snížit účinnost ztrátou jeho sorpčních vlastností. Nanesení vzorku je druhý krok. Zajistíme průchod samotného vzorku při konstantní rychlosti odkapávání. Následuje *promytí* kolonky opět rozpouštědlem (Milli-Q voda, 3 ml) a kolonku necháme sušit po dobu několika minut. V závěrečném kroku provádíme *eluci*. Zvolíme menší množství elučního činidla (methanol) a opět jej nadávkuje do kolonek. Množství se odvíjí od použitého sorbentu a jeho hmotnosti. Na obrázku č. 7 je zobrazené schéma práce s kolonkou při metodě SPE. [36, 51]

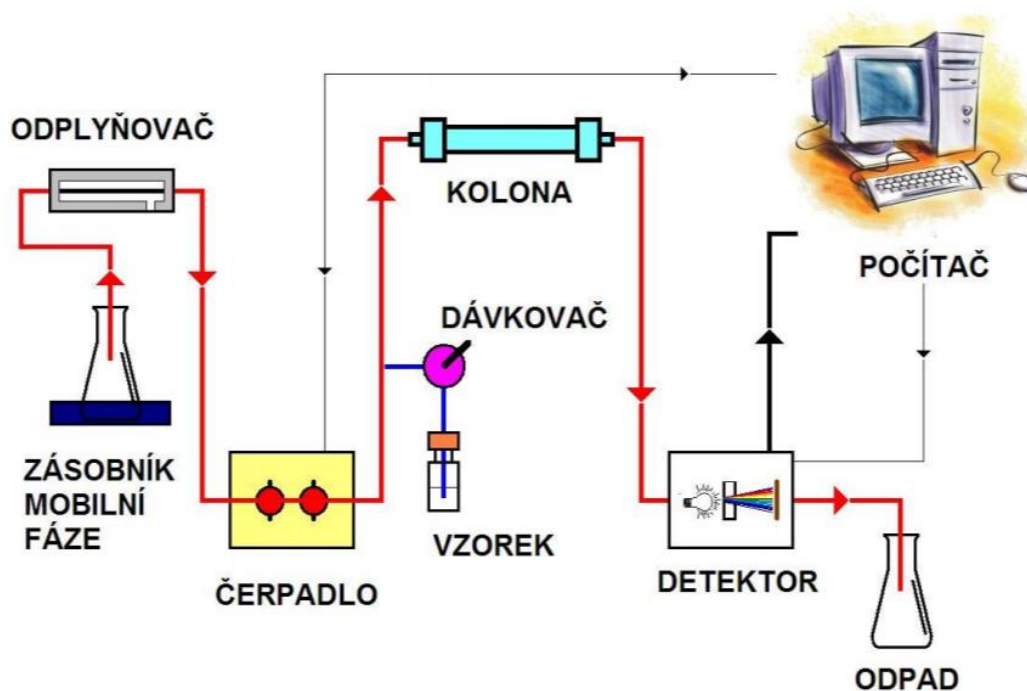
2.8 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je velmi oblíbenou analytickou metodou pro stanovení netěkavých látek s nízkou koncentrací, a to pro svoji univerzálnost a rychlé stanovení širokého spektra látek. Obecně je chromatografie založena na separaci látek za pomoci mobilní a stacionární fáze, v závislosti na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech. V porovnání s klasickou sloupcovou chromatografií obsahuje i vysokotlaké čerpadlo, schopné umožnit průtok mobilní fáze kolonou menších rozměrů, kde je umístěna stacionární fáze se solventem. Tím dosahuje mnohem větší účinnosti separace látek ve srovnání s klasickou sloupcovou chromatografií. Při rozdílné distribuci analytů mezi fázemi dochází k separaci. Pro separaci antibiotik je často využíván systém s obrácenými fázemi [53].

Existují čtyři základní druhy separačních mechanismů:

- a) Adsorpce
- b) Rozdělování
- c) Výměna iontů
- d) Síťový efekt

Vyjádření účinnosti separace lze provést pomocí počtu teoretických pater. Teoretické patro reprezentuje pomyslnou část kolony, ve které dochází k ustálení rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází. Výškový ekvivalent teoretického patra je pak roven délce kolony podělené počtem teoretických pater. Vysoká účinnost separace je proto podmíněna velkým počtem výškových ekvivalentů teoretického patra. Důležitá je také volba použité mobilní fáze. Pro stanovování makrolidů se používá například gradient binární směsi octanu amonného a acetonitrilu. Případně se jedná o Milli-Q vodu s přídavkem kyseliny octové a acetonitrilu. Výrobním materiálem kolon bývá často antikorozní materiál, nejčastěji nerezová ocel. Na obrázku č. 8 je zobrazeno schéma zapojení HPLC [5, 53, 54].



Obrázek č. 8 Schéma HPLC [55]

2.9 Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Účelem použití ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie je separace velkého počtu analytů v krátkém časovém úseku. V literatuře se můžeme setkat se zkratkou UPLC nebo UHPLC. Největším rozdílem proti klasické HPLC je použití menších částic stacionární fáze. Celý separační proces probíhá za velmi velkých tlaků (1500 psi, 1000 bar, 100 MPa). Běžně je maximální průtoková rychlost do 5 ml/min. Chromatografické kolony mají částice menší jak 2 μm , v ideálním případě hodnotu 1,7 μm . Tyto specifické vlastnosti umožňují zkrácení kolony (proti standardním HPLC kolonám). Dokonce je dosahováno zvýšení účinnosti kolony.

Hlavními přednostmi UPLC jsou:

- kratší doba analýzy
- snížení spotřeby mobilní fáze
- zvýšení separační účinnosti kolony
- snížení meze detekce a zvýšení citlivosti
- více kvantitativních informací.

Transformace využívaných metod z HPLC na UPLC je triviální. Vědecký pracovník by si měl dát pouze pozor na změnu objemového průtoku mobilní fáze, nástřik a dobu analýzy [5, 56].

2.9.1 Běžně používané detektory v HPLC/UHPLC

Pomocí detektorů se fyzikálně-chemické vlastnosti námi sledovaného eluátu mění na elektrický signál, který je posléze vyhodnocen softwarem na počítači. V současnosti se v převážné míře využívají detektory koncentrační. Dělíme je na selektivní a univerzální. Základní podmínkou použitelnosti detektoru je lineární závislost odezvy v širokém koncentračním rozmezí stanovené látky a plná automatizace záznamu. Oblast linearity je vymezena intervalem odezvy detektoru, kdy odchylka od lineárního průběhu odezvy detektoru v závislosti na koncentraci je menší než 2 %. Směrnice lineární závislosti je mírou citlivosti daného detektoru. Minimální detekovatelné množství složky (mez detekce) je určeno nejmenším množstvím, které detektor prokazatelně zaznamená, přičemž odezva detektoru se při mezi detekce má rovnat alespoň dvojnásobné hodnotě hladiny šumu detekce. Šumem se míní kolísání odezvy detektoru způsobené náhodnými změnami nulové linie (malá časová konstanta, vysoká frekvence). Driftem se rozumí dlouhodobá nestabilita nulové linie při průtoku čisté mobilní fáze. [56, 57]

Nejpoužívanější detektory jsou:

- a) UV-VIS spektrofotometrický detektor
- b) Detektory s diodovým polem (DAD)
- c) Fluorescenční detektory
- d) Hmotnostně spektrometrický detektor

2.9.1.1 UV-VIS spektrofotometrický detektor

Ve své podstatě je UV-VIS detektor založen na stejném principu jako UV-VIS spektrofotometr, avšak s tím rozdílem, že místo kyvety se vzorkem prochází paprsek průtokovou celou s eluátem z kolony. Velká většina organických látek absorbuje v oblasti UV záření, některé i v oblasti viditelného světla. Detektory mají buď fixní vlnovou délku (nejčastěji 254 nm), s možností výběru jiných vlnových délek, nebo mají monochromátor a pracují na principu spektrofotometru v rozsahu 190–400 nm. Detektor registruje zeslabení signálu procházejícího celou v důsledku přítomnosti látek, které mohou absorbovat záření [53, 56, 57].

2.9.1.2 Detektory s diodovým polem (DAD)

Jedná se o velmi univerzální detektor s poměrně dobrými mezemi detekce. Umožňuje získat spektrální data látek v průběhu celé analýzy, a to bez přerušení chromatografické separace. Průtokovou celou prochází polychromatické světlo; transmitované záření je spektrálně rozkládáno holografickou mřížkou, takže na každou z miniaturních fotodiod dopadá zářivý tok o určité vlnové délce, zeslabený absorpcí v průtokové cele detektoru. Je třeba mít k dispozici specifický software pro používání DAD detekce. Tento by měl umožňovat např. průběžné hodnocení tzv. „čistoty píků“, identifikaci neznámých složek pomocí spektrální knihovny, rychlé stanovení absorpčního maxima látky, kvantifikaci píků s odlišnými spektrálními vlastnostmi v jedné analýze apod. [53, 56, 57].

2.9.1.3 Fluorescenční detektory

Měří sekundární (emisní) záření, která látka vyzáří po absorpci primárního (excitačního) záření, přičemž dochází k prudkým přechodům částic do vyšších vibračních hladin. To má za následek vyzáření absorbované energie v podobě fluorescence, kterou můžeme detekovat. Jedná se o velice selektivní a citlivé detektory pro látky schopné fluorescence. Emitované záření se měří kolmo, prochází přes emisní monochromátor na fotonásobič. Díky přítomnosti monochromátoru lze manipulovat se změnou vlnové délky excitačního i emitovaného záření. Fotonásobič pak registruje emitované záření, které na něj dopadá. Ten pak poskytuje proud úměrný toku emitovaného fluorescenčního záření a koncentraci analyzované látky v cele detektoru. Zdrojem záření bývá obvykle rtuťová výbojka. Modernější provedení upřednostňuje využití šetrnější xenonové výbojky [53, 56, 57].

2.9.1.4 Hmotnostní spektrometrická detekce

Po spektrofotometrické detekci je druhou nejčastěji využívanou metodou detekce při využití kapalinové chromatografie. Pracuje na principu interakce iontů (forma hmoty) s polem (elektrické a magnetické). Ionty vznikají primárně ionizací analytu, potom se ionty rozdělují podle poměru hmotností a náboje (m/z) a jejich urychlení v analyzátoru. Poslední krok obnáší detekci iontů a zesílení signálu v detektoru. Snímání hmotnostního spektra během eluce látek je velmi výhodné pro strukturní analýzu a identifikaci látek ve složitých směsích [36, 56].

3 Experimentální část

3.1 Přístroje a využitá zařízení

- Analytické váhy HR-EC, A&D Instruments, Japonsko
- pH metr inoLab 730, WTW Series, WTW Německo
- Přístroj pro přípravu Milli-Q vody Millipore, Academic
- Filtr skleněná vlákna MN GF 3, 55 mm
- Filtr nylonový Chromservis, 13 mm
- SPE extraktor Baker, model spe – 12G, s vakuovou pumpou, Barmany, Co., USA
- Vakuová pumpa KNF LAB LABOPORT
- Přístroj pro sušení pod dusíkem Evaterm, LABICOM s. r. o.
- SPE kolonky Oasis® HLB (60 mg) Extraction Cartridge, Waters, USA
- kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series, Agilent, USA
 - detektor hmotnostní spektrometr Agilent 6300 Ion Trap, Agilent, USA
 - kolona Kinetex 2.6µm C18 100A HPLC Column 150 x 2.1 mm, Phenomenex, USA
- Generátor dusíku pro MS
- Běžné laboratorní sklo a pomůcky

3.2 Software použitý ke zpracování dat

MS Excel 2016

MS Word 2016

ChemStation for LC & LC/MS Systems, version 32.1, Agilent, USA

Výstřižky, Microsoft, USA

3.3 Použité chemikálie a standardy

Acetonitril – CHROMASOLV® grad. grade, for HPLC $\geq 99,9\%$, Sigma Aldrich

Kyselina mravenčí – $\geq 98\%$, Sigma Aldrich

Methanol, HPLC grade, Biosolve, Nizozemsko

Dusík, čistota 4.7, SIAD, Česká republika

Deionizovaná voda upravená přístrojem Milli-Q® Academic

3.4 Standardy

Clarithromycin D3, 5 mL, 10 ug/ml v methanolu, Sigma-Aldrich, USA

Trimethoprim D9, 5 mL, 10 ug/ml v methanolu, Sigma-Aldrich, USA

3.5 Analyzované matrice

Odpadní voda z ČOV Brno-Modřice. Byla analyzována voda na přítoku a na odtoku.

3.6 Sledované analyty

Po konzultaci s vedoucím práce bylo rozhodnuto sledovat koncentraci vybraných antibiotik v odpadních vodách; konkrétně azithromycin a clarithromycin ze skupiny makrolidových antibiotik. Dále trimethoprim, který je chemoterapeutického původu.

3.7 Postup stanovení

3.7.1 Odběr vzorků

V průběhu 12 dnů byly odebírány směsné slévané 24hodinové vzorky z přítoku a na odtoku odpadní vody na ČOV Brno-Modřice. První odběr proběhl dne 1. 4. 2019 a poslední odběr byl uskutečněn dne 12. 4. 2019. Vzorky byly přelity do tmavých skleněných vzorkovnic o objemu 1 l a v rozmezí několika hodin filtrovány. Zfiltrované vzorky byly do doby zahájení analýzy skladovány při teplotě 4 °C v chladničce, pokud nebyla zahájena analýza již téhož dne. Nejpozději však byla zahájena do 24 hodin od samotného odběru.

3.7.2 Příprava vzorků

Vzhledem k předpokládanému velkému znečištění bylo nutné odstranit pevné částice v odpadní vodě. Byla provedena filtrace přes skleněný filtr s pomocí vakuové pumpy. U vody odebrané na přítoku bylo zfiltrováno 100 ml a na odtoku 200 ml vzorku. Vzorky byly slity do Erlenmayerovy baňky a označeny, pokud nedošlo již téhož dne k zahájení extrakcí. V případě zahájení byl vzorek slit do kádinky o příslušném objemu a řádně označen.

3.7.3 Přečištění a zakoncentrování vzorku pomocí metody SPE

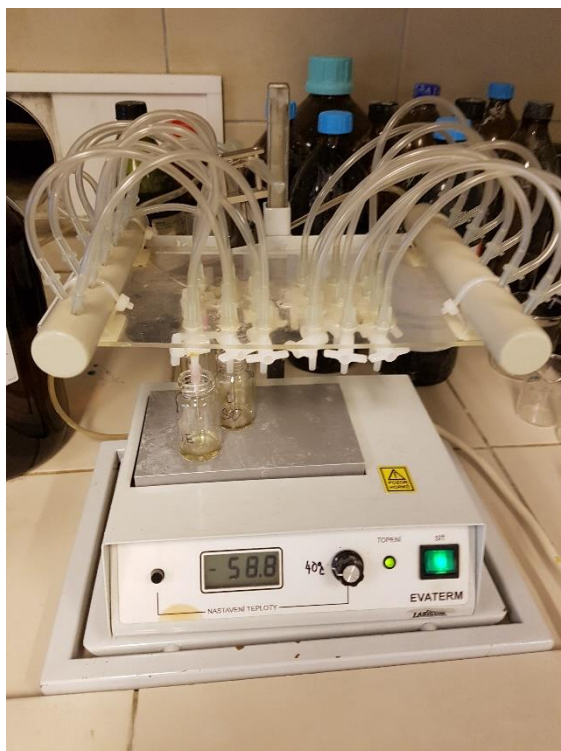
Nadávkujeme 100 μ l interních standardů a necháme 30 minut ustavit rovnováhu. Kolonku je nutné před samotnou extrakcí připravit. Je proto nutné provést kondicionaci a ekvilibraci. Na obrázku č. 9 je zobrazena SPE aparatura pro extrakci.

- kondicionace: nechá se projít kolonkou 6 ml čistého methanolu. Na obrázku č. 11 je zobrazena kolonka Oasis® HLB (60 mg)
- ekvilibrace 6 ml Milli-Q vody
- nanesení vzorku o objemu 200 ml v případě přítoku a 100 ml v případě odtoku
- promytí vzorku 3 ml Milli-Q vody
- sušení pomocí vakua 20 minut
- eluce: 2 \times 5 ml methanolu
- sušení vzorku pod plynným dusíkem; zobrazeno na obrázku č. 10
- rozpuštění v 1 ml směsi methanolu a Milli-Q vody v poměru 30 : 70
- Nanesení cca 800 μ l vzorku do chromatografické vialky

Po rozpuštění vzorku ve směsi methanolu a Milli-Q vody v poměru 30 : 70 je v případě podezření ze znečištění nutné před analýzou na HPLC roztok přefiltrovat. Byly použity nylonové filtry o průměru 13 mm. Snižujeme tak případné riziko zanesení nečistot do chromatografické kolony. Ta je v HPLC systému jistým filtrem a tím pádem i nejvíce náchylná k zanesení.

Obrázek č. 9 SPE aparatura, fáze nanášení vzorku





Obrázek č. 10 Přístroj pro sušení pod dusíkem Evaterm



Obrázek č. 11 SPE kolonky Oasis® HLB (60 mg)

3.7.4 Identifikace a kvantifikace analytu

Pro identifikaci a kvantifikaci léčiv byla zvolena metoda HPLC/MS. Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie byla propojena s hmotnostní spektrometrií. K separaci byl použit kapalinový chromatograf Agilent 1100 a vlasdní detekce probíhala na hmotnostním spektrometru Agilent Iont Trap 6320. Analyt byl separován na koloně KINETEX C18 (2,1x150 mm). Pro kvalitativní určení byly využity retenční časy jednotlivých analytů. Pro ionizační techniku byl použit elektrosprej, analyzátozem byla sférická iontová past. Pomocí hmotnostního spektrometru byly sledovány a vyhodnocovány amplitudy a fragmenty jednotlivých léčiv. Pro každý analyt byla vybrána charakteristická hmota m/z , která představuje jejich kvazimolekulární iont. Pro vyhodnocování koncentrací byl využit výrobcem dodaný software, který po kalibraci umožnil vypočítat plochy píků analytu s příslušným interním standardem. Přístroje HPLC a MS jsou zobrazeny na obrázku č. 12.

3.7.5 Podmínky měření

Tabulka č. 2 Podmínky chromatografického měření

Mobilní fáze:	A: acetonitril B: 0,01M roztok HCOOH v Milli-Q vodě
Gradient mobilní fáze:	do 0,2 min 5 % A,
	pak nárůst do 13,6 minuty na 70 % A,
	setrvání do 15 minuty na 70 % A,
	dále nárůst na 98 % A do 15,5 minuty,
	držení do 18,5 minuty,
	pak pokles zpět na 5 % A do 20 minuty,
	posttime 14 minut
Nástřik:	2 μ l
Průtok mobilní fáze:	0,22 ml/min
Kolona	KINETEX C18, 2.1x150 mm, velikost částic 2,6 μ m
Teplota kolony:	40 °C
Délka analýzy:	34 minut

Tabulka č. 3 Parametry hmotnostního spektrometru

Tlak zmlžovače	25 psi
Průtok sušícího dusíku	10 l/min
Sušící teplota	350 °C

Tabulka č. 4 Retenční časy jednotlivých analytů

Analyty	Retenční čas [min]
Trimethoprim D9	8,7
Trimethoprim	8,8
Azithromycin	10,4
Clarithromycin	13,7
Clarithromycin D3	13,6

Tabulka č. 5 MRM parametry

Analyt	Specifická m/z prekurzoru	Fragmenty m/z	Amplituda [V]
Trimethoprim	291,1	230	0,99
Azithromycin	375,2	591,4	0,62
Clarithromycin	748,4	590,3	0,64
Trimethoprim D9	300,1	234	1,02
Clarithromycin D3	751,4	593,3	0,61



Obrázek č. 12 HPLC (vlevo) Hmotnostní spektrometr (vpravo)

4 Výsledky a diskuze

4.1 Optimalizace chromatografických podmínek

Před provedením chromatografické analýzy reálných vzorků byla provedena optimalizace podmínek separace na příslušném přístroji. Bylo optimalizováno složení mobilní fáze a její gradient, dále teplota kolony a objem nástriku. Vzhledem k přítomnosti pouze jedné kolony nebylo nutné provádět analýzy vlastností jednotlivých kolon před samotným zahájením separace. Vlastnosti kolony nelze ovlivňovat, proto je možné měnit parametry pouze výměnou za jiný typ. Výběr kolony má pro separaci největší význam, avšak s tímto omezením bylo při měření nutné počítáno.

4.2 Optimalizace parametrů MS

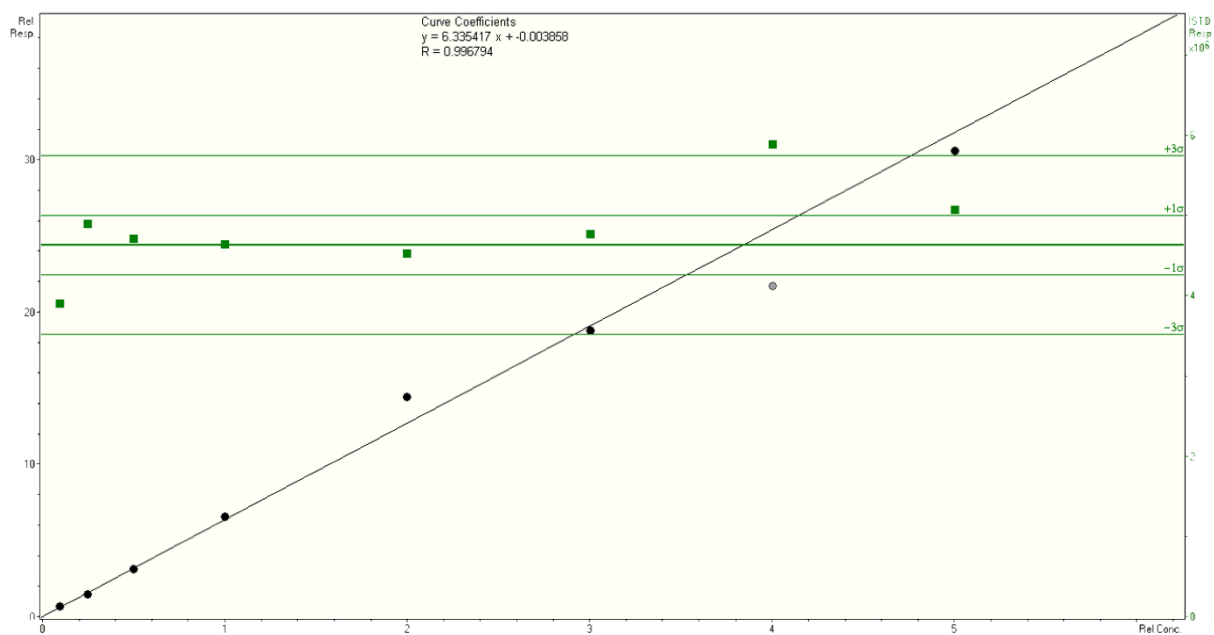
Parametry pro MS byly primárně nastaveny vzhledem k průtoku mobilní fáze. Pro vyladění byly využity tabelované hodnoty. Primárně bylo nutné vyladit hodnoty pro přímé infuze a MRM parametrů.

4.3 Výsledná metoda HPLC/MS

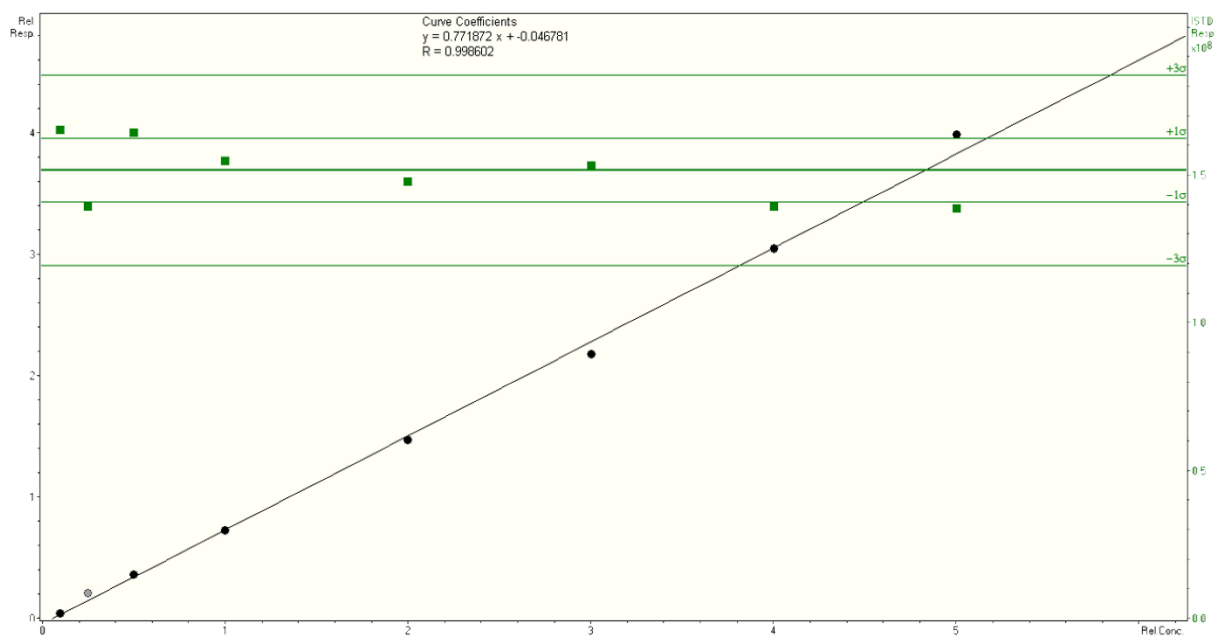
Parametry samotné analýzy byly již částečně připravené v součinnosti s konzultantkou paní Ing. Landovou dopředu. Bylo však nutné je ještě optimalizovat pro námi měřená léčiva. Podmínky separace po dosažení optimalizace jsou uvedeny v tabulkách č. 2 a č. 3. Celkový čas analýzy trvá 34 minut pro jeden vzorek. Pro správnou opakovatelnost měření je třeba před započítáním další analýzy vyčkat několik minut pro vyrovnání tlaku na koloně. Tlak signalizuje správný poměr mobilní fáze, tj. stejné počáteční složení mobilní fáze v koloně jako u předchozího vzorku. Retenční časy analyzovaných látek jsou uvedeny v tabulce č. 4.

4.4 Vyhodnocení dat

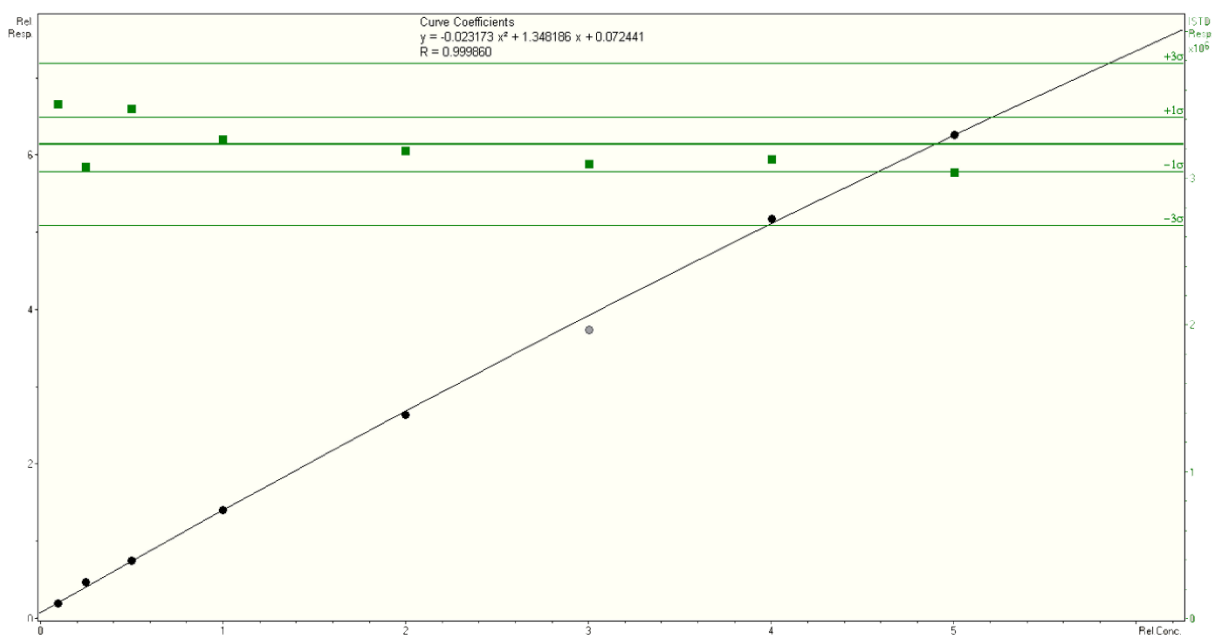
Pro vyhodnocení koncentrací byl využit výrobcem dodaný software. Po zadání příslušných údajů (MRM přechody a retenční čas) software vyhodnotil plochy píků analytu a příslušného interního standardu. Kalibrační roztoky byly připraveny ze vzorků o známé koncentraci v rozmezí 10–500 ng/ml, konkrétně při koncentracích 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 a 500 ng/ml. Kalibrační křivky jsou lineární pro Azithromycin a Clarithromycin. Kalibrační křivka pro Trimethoprim je kvadratická. Součástí jsou rovnice regrese a koeficienty spolehlivosti. Získané kalibrace pro jednotlivá léčiva jsou přiloženy jako obrázky č. 13, 14, 15.



Obrázek č. 13 Kalibrace Azithromycinu



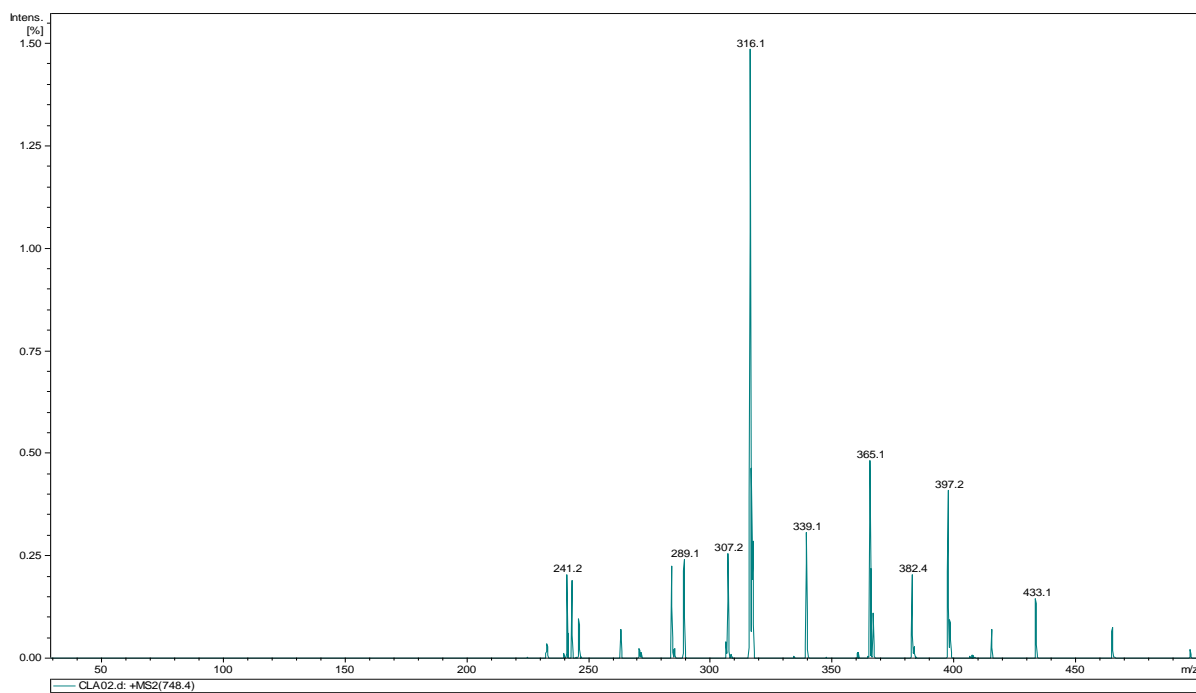
Obrázek č. 14 Kalibrace Clarithromycinu



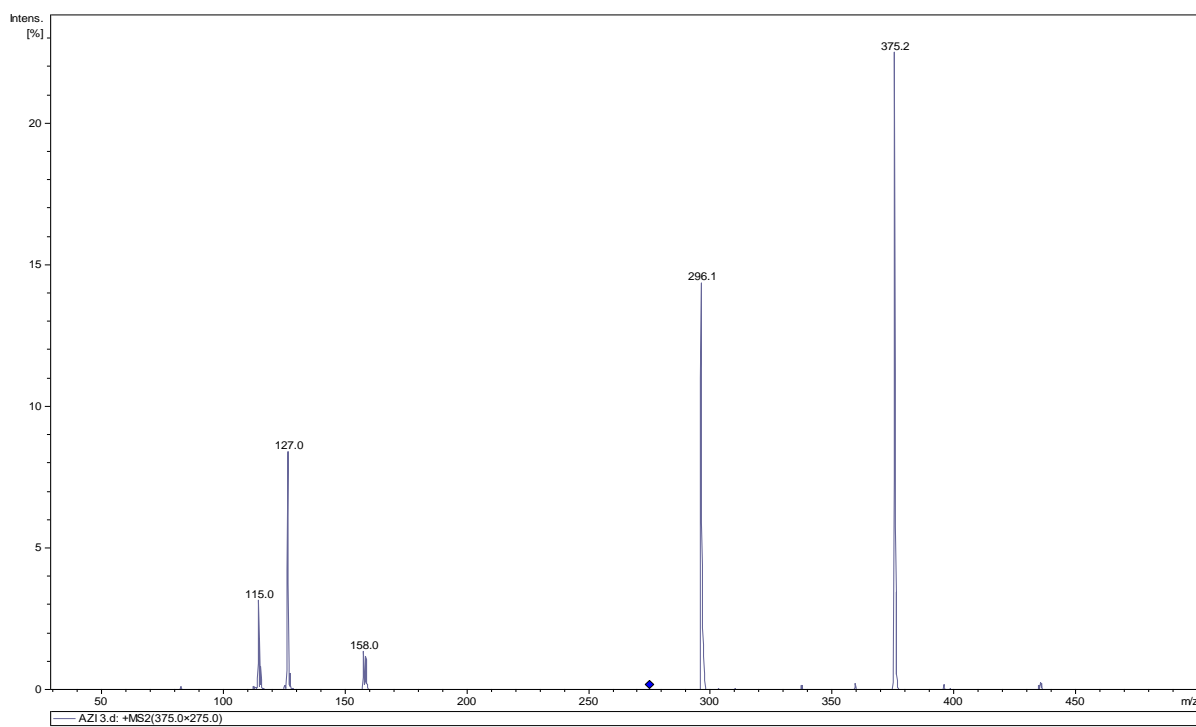
Obrázek č. 15 Kalibrace Trimethoprimu

4.5 Chromatogramy a hmotnostní spektra

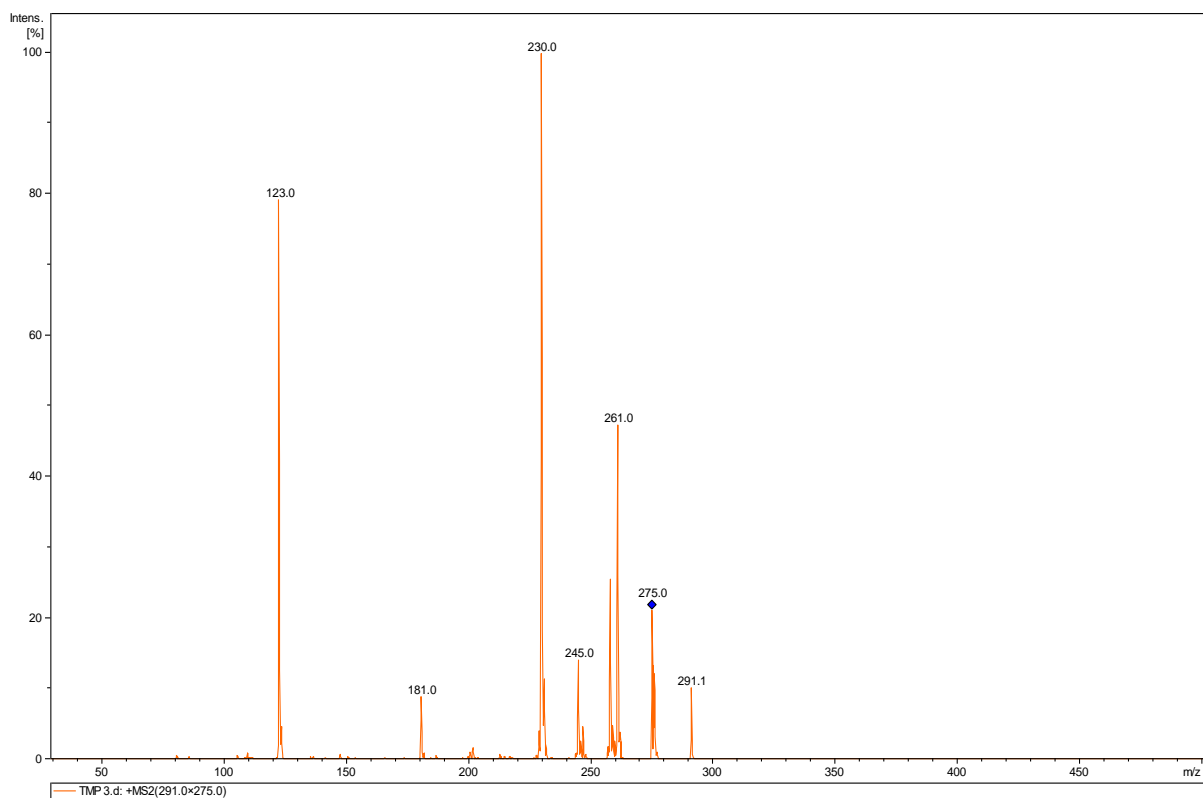
Na obrázcích č. 16, 17, 18 jsou zobrazena hmotnostní spektra zkoumaných léčiv. Na obrázku č. 19 je vyobrazen chromatogram standardu. Obrázky č. 20 a 21 ukazují chromatogramy na přítoku a na odtoku ze dne 1. 4. 2019. V jednotlivých chromatogramech jsou označeny píky pro Azithromycin, Clarithromycin a Trimethoprim. Rovněž jsou zde naznačeny píky interních standardů Clarithromycin D3 a Trimethoprim D9.



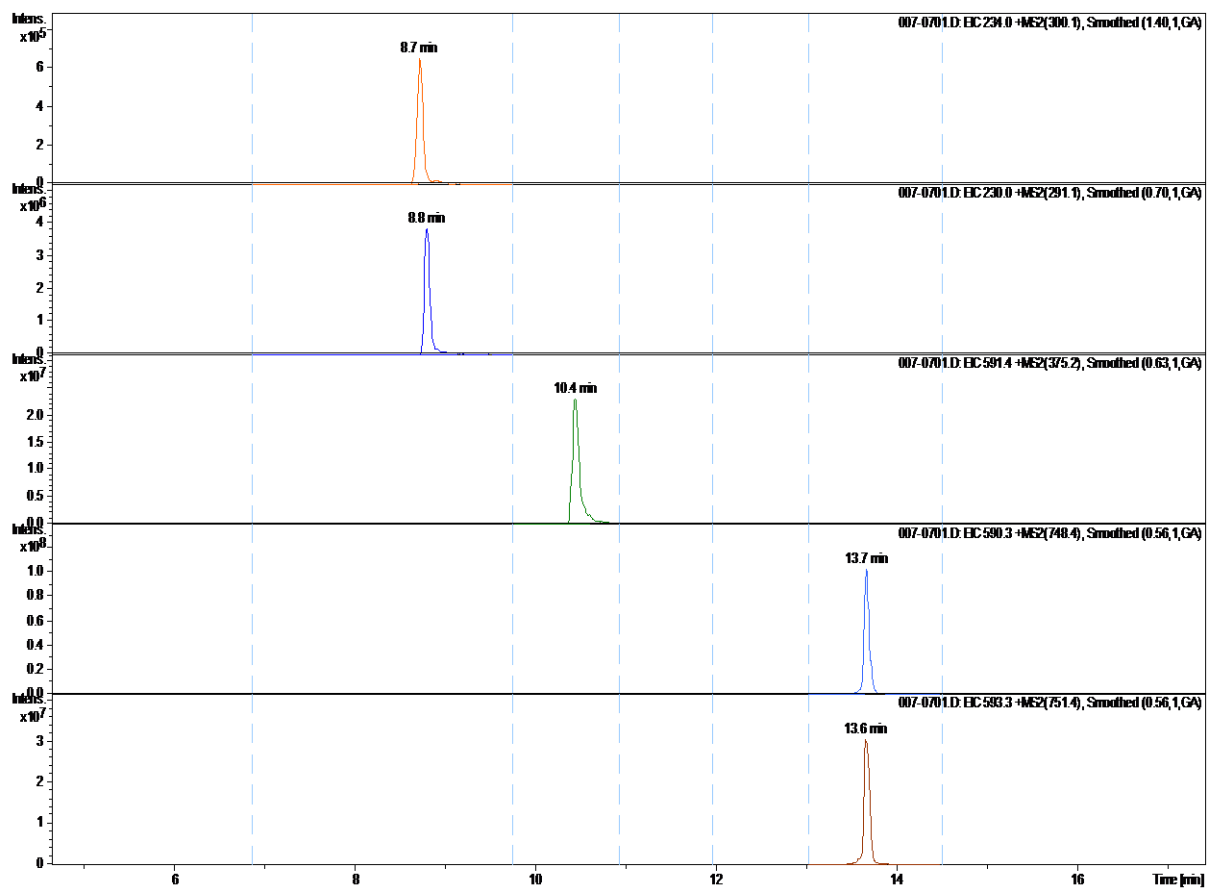
Obrázek č. 16 hmotnostní spektrum Clarithromycinu



Obrázek č. 17 hmotnostní spektrum Azithromycinu

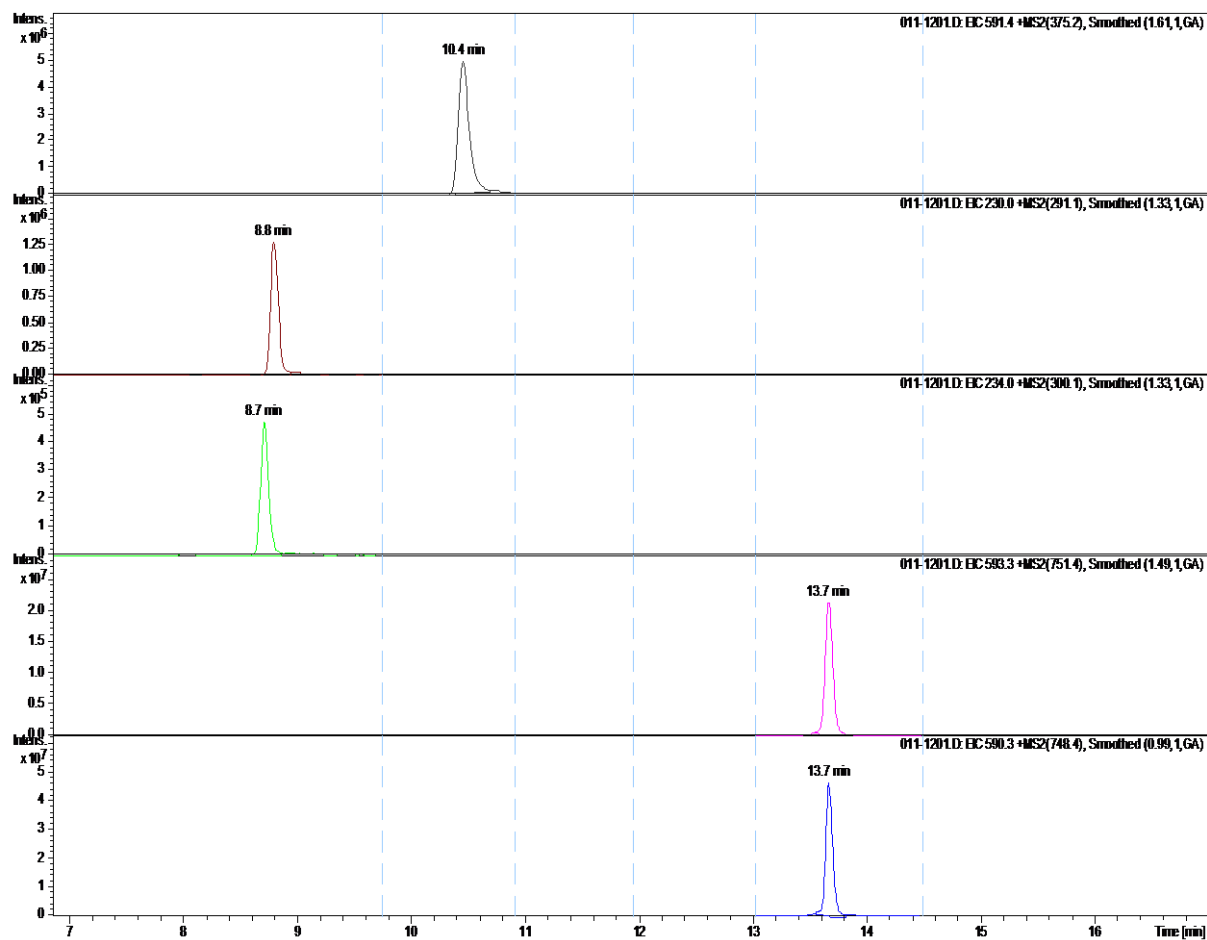


Obrázek č. 18 hmotnostní spektrum Trimethoprimu



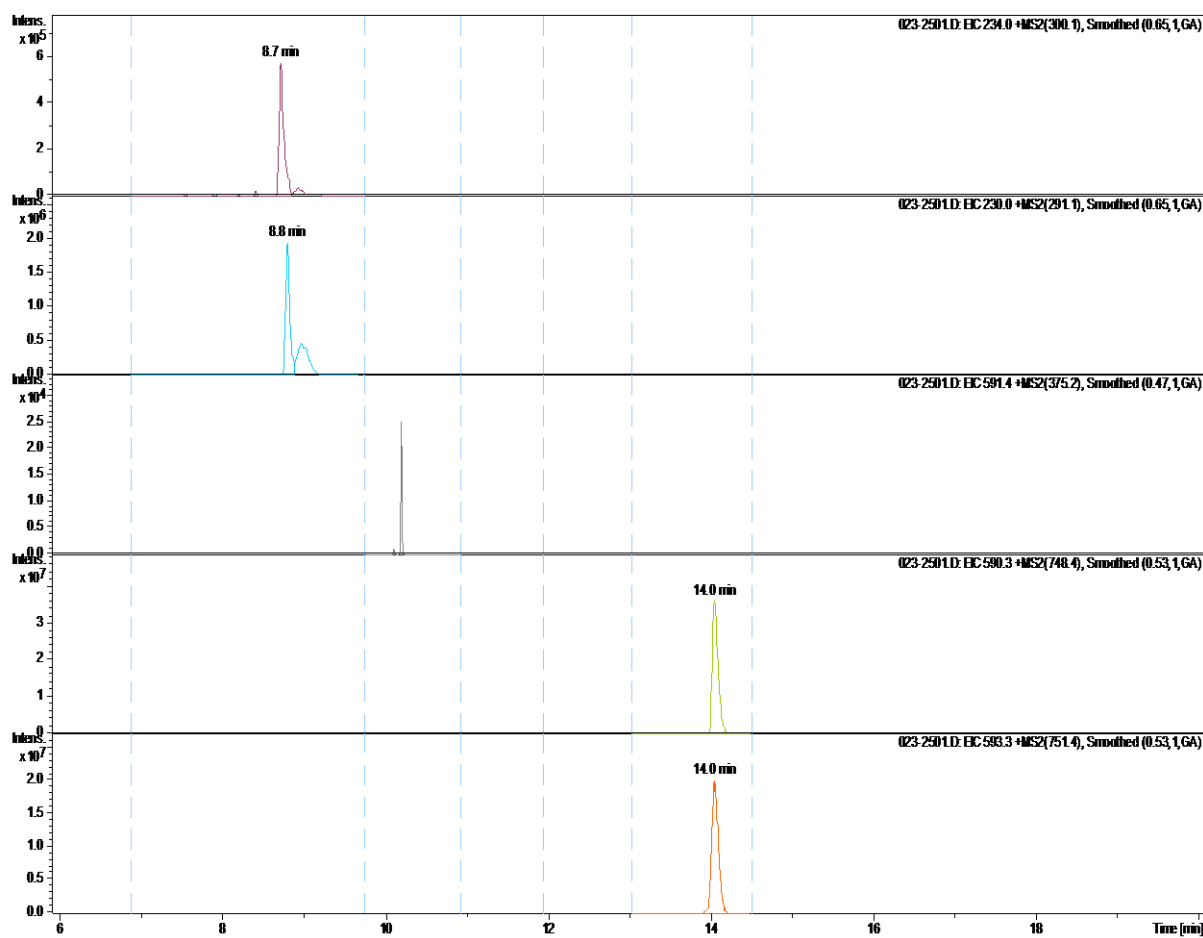
Pořadí	Barvy	Léčivo	Retenční čas [min]
1		Trimethoprim D9	8,7
2		Trimethoprim	8,8
3		Azithromycin	10,4
4		Clarithromycin	13,7
5		Clarithromycin D3	13,6

Obrázek č. 19 Chromatogram standardů



Pořadí	Barvy	Léčivo	Retenční čas [min]
1		Azithromycin	10,4
2		Trimethoprim	8,8
3		Trimethoprim D9	8,7
4		Clarithromycin D3	13,7
5		Clarithromycin	13,7

Obrázek č. 20 Chromatogram odtok 1. 4. 2019



Pořadí	Barvy	Léčivo	Retenční čas [min]
1		Trimethoprim D9	8,7
2		Trimethoprim	8,8
3		Azithromycin	10,3
4		Clarithromycin	14,0
5		Clarithromycin D3	14,0

Obrázek č. 21 chromatogram přítoku 1. 4. 2019

4.6 Reálné vzorky

Optimalizovaná metoda byla použita pro analýzu reálných vzorků odpadní vody. Vzorky odpadní vody byly odebrány ve dnech 1. 4. až 12. 4. 2019 na ČOV Brno-Modřice. Vždy byl odebrán jeden vzorek na přítoku a jeden na odtoku z ČOV. V tabulkách č. 4, 5, 6 jsou uvedeny údaje o výsledcích měření v jednotlivých dnech. Pro přehledné znázornění jsou koncentrace léčiv vyobrazeny na obrázcích č. 10, 11, 12 v obou parametrech, s výjimkou u Azithromycinu.

Tabulka č. 6 Azithromycin

Datum	Den	Přítok [ng·l ⁻¹]	Odtok [ng·l ⁻¹]	pH přítoku	pH odtoku
1. 4. 2019	Pondělí	ND	952,23	8,00	8,15
2. 4. 2019	Úterý	ND	1000,44	8,19	7,66
3. 4. 2019	Středa	ND	953,14	7,97	7,70
4. 4. 2019	Čtvrtek	ND	885,63	8,01	8,02
5. 4. 2019	Pátek	ND	929,19	8,07	8,12
6. 4. 2019	Sobota	ND	954,30	8,03	8,07
7. 4. 2019	Neděle	ND	920,47	7,97	7,93
8. 4. 2019	Pondělí	ND	874,11	7,87	7,87
9. 4. 2019	Úterý	ND	1126,93	7,87	7,69
10. 4. 2019	Středa	ND	996,21	7,92	7,62
11. 4. 2019	Čtvrtek	ND	867,54	7,79	7,55
12. 4. 2019	Pátek	ND	758,69	7,96	7,56
Průměr		ND	934,91	7,97	7,82

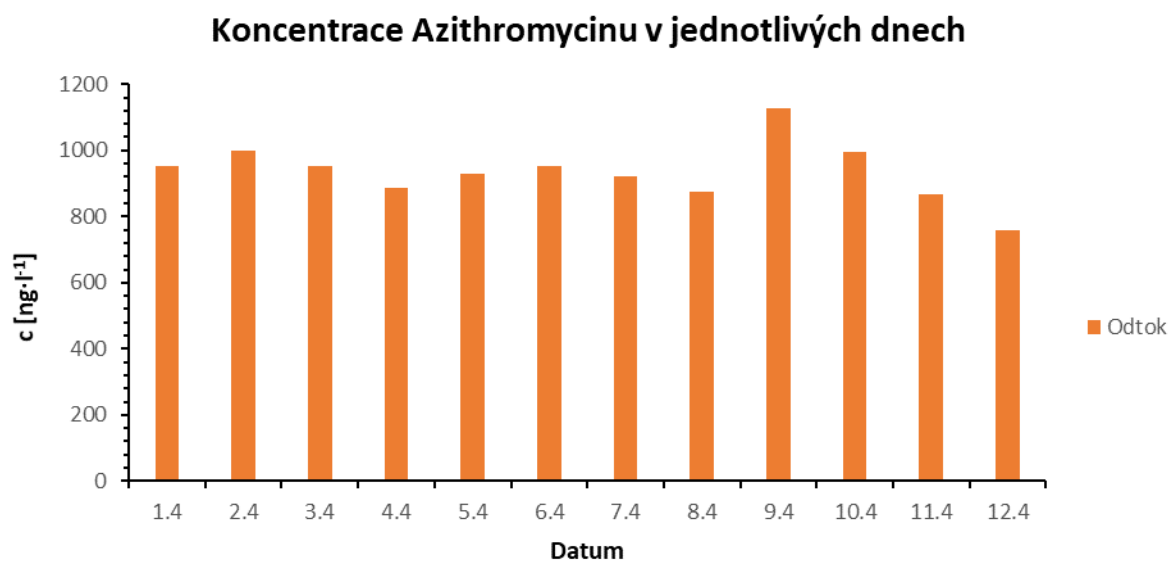
Chybějící hodnoty na přítoku jsou označeny ND. V reálných vzorcích mohly být pravděpodobně přítomny, avšak přístroj je nebyl schopen detekovat. Po odborné konzultaci s vedoucím práce a konzultantkou byla tato chyba přisouzena s největší pravděpodobností silnému matričnímu efektu vzorku. Vzorky byly několikrát přeměřovány s cílem eliminovat matriční efekt, avšak nebylo dosaženo kýženého výsledku. Z diskuze vyplynulo, že pro naměření potřebných hodnot by bylo nutné zvolit metodu měření s vyššími mezemi detekce, případně zvolit jiný postup přípravy vzorku (možný je i jiný postup na SPE).

Tabulka č. 7 Clarithromycin

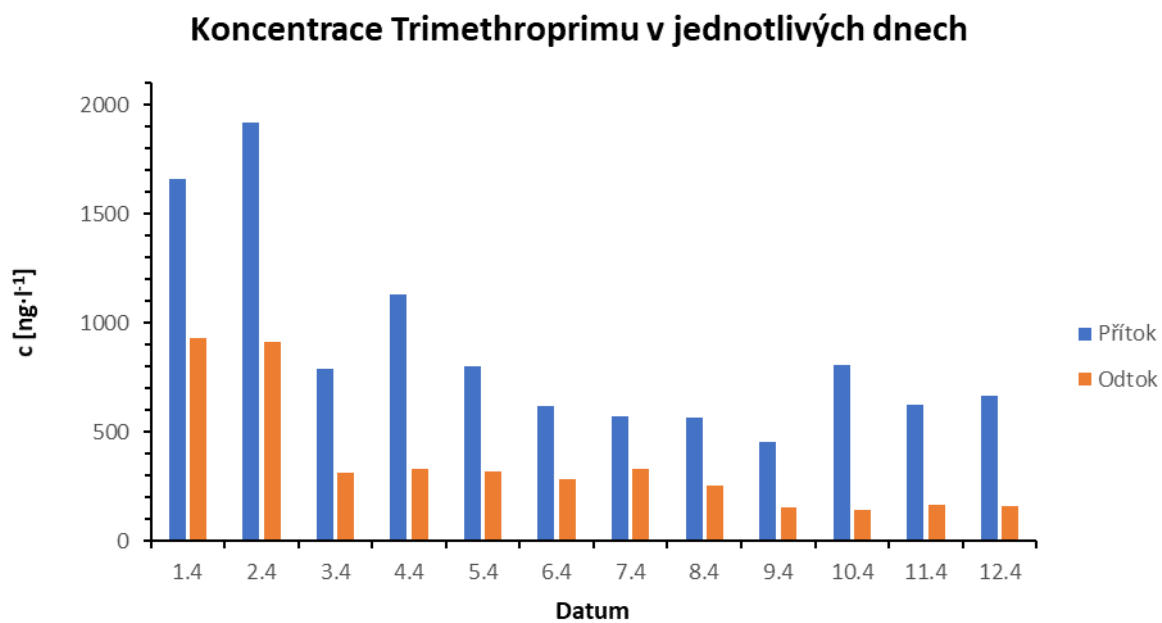
Datum	Den	Přítok [ng·l ⁻¹]	Odtok [ng·l ⁻¹]	pH přítoku	pH odtoku
1. 4. 2019	Pondělí	1515,94	1327,64	8,00	8,15
2. 4. 2019	Úterý	4362,12	1280,77	8,19	7,66
3. 4. 2019	Středa	3124,05	1253,34	7,97	7,70
4. 4. 2019	Čtvrtek	1251,89	1352,39	8,01	8,02
5. 4. 2019	Pátek	5773,49	1192,34	8,07	8,12
6. 4. 2019	Sobota	1738,61	1305,87	8,03	8,07
7. 4. 2019	Neděle	2421,09	1258,90	7,97	7,93
8. 4. 2019	Pondělí	2069,41	1306,11	7,87	7,87
9. 4. 2019	Úterý	1149,91	1244,26	7,87	7,69
10. 4. 2019	Středa	2967,17	1173,28	7,92	7,62
11. 4. 2019	Čtvrtek	1356,53	1292,68	7,79	7,55
12. 4. 2019	Pátek	7816,23	1268,98	7,96	7,56
Průměr		2962,20	1271,38	7,97	7,82

Tabulka č.8 Trimethoprim

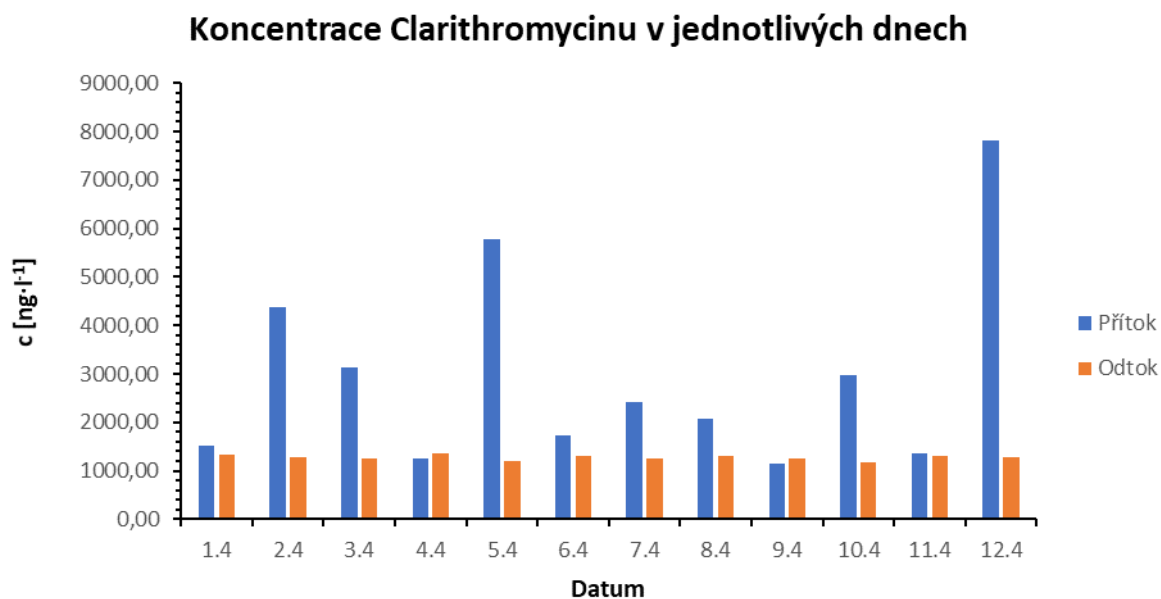
Datum	Den	Přítok [ng·l ⁻¹]	Odtok [ng·l ⁻¹]	pH přítoku	pH odtoku
1. 4. 2019	Pondělí	1660,62	933,28	8,00	8,15
2. 4. 2019	Úterý	1918,40	911,55	8,19	7,66
3. 4. 2019	Středa	790,26	313,87	7,97	7,70
4. 4. 2019	Čtvrtek	1132,99	332,90	8,01	8,02
5. 4. 2019	Pátek	801,76	318,21	8,07	8,12
6. 4. 2019	Sobota	617,93	286,23	8,03	8,07
7. 4. 2019	Neděle	571,04	327,67	7,97	7,93
8. 4. 2019	Pondělí	565,41	254,00	7,87	7,87
9. 4. 2019	Úterý	453,97	151,99	7,87	7,69
10. 4. 2019	Středa	808,57	142,99	7,92	7,62
11. 4. 2019	Čtvrtek	622,82	164,11	7,79	7,55
12. 4. 2019	Pátek	666,46	157,86	7,96	7,56
Průměr		884,19	376,08	7,97	7,82



Obrázek č. 22 Koncentrace Azithromycinu v jednotlivých dnech

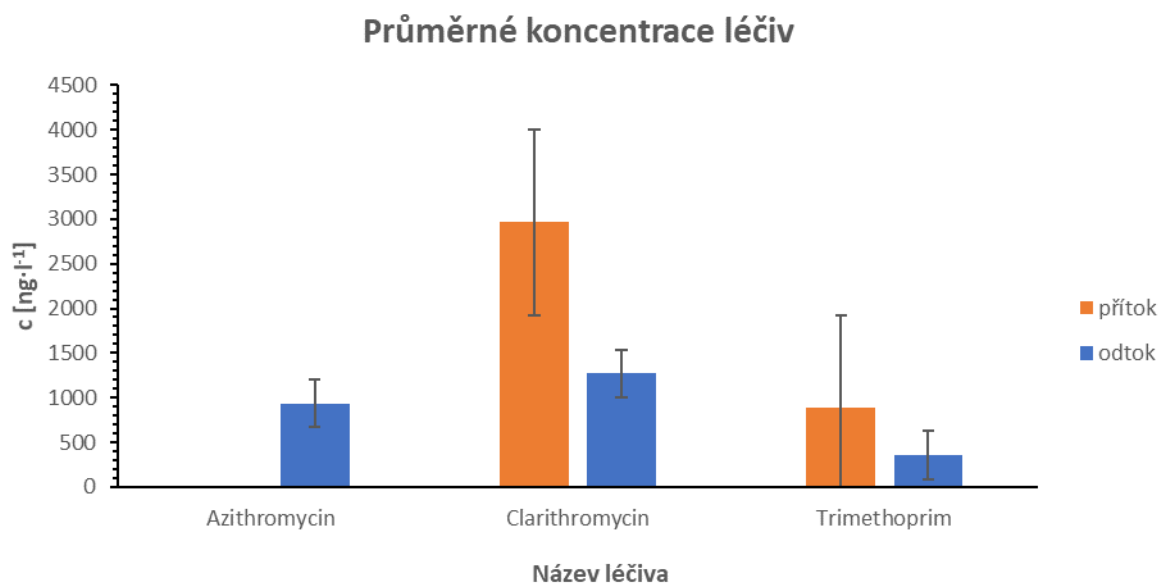


Obrázek č. 23 Koncentrace Trimethoprimu v jednotlivých dnech

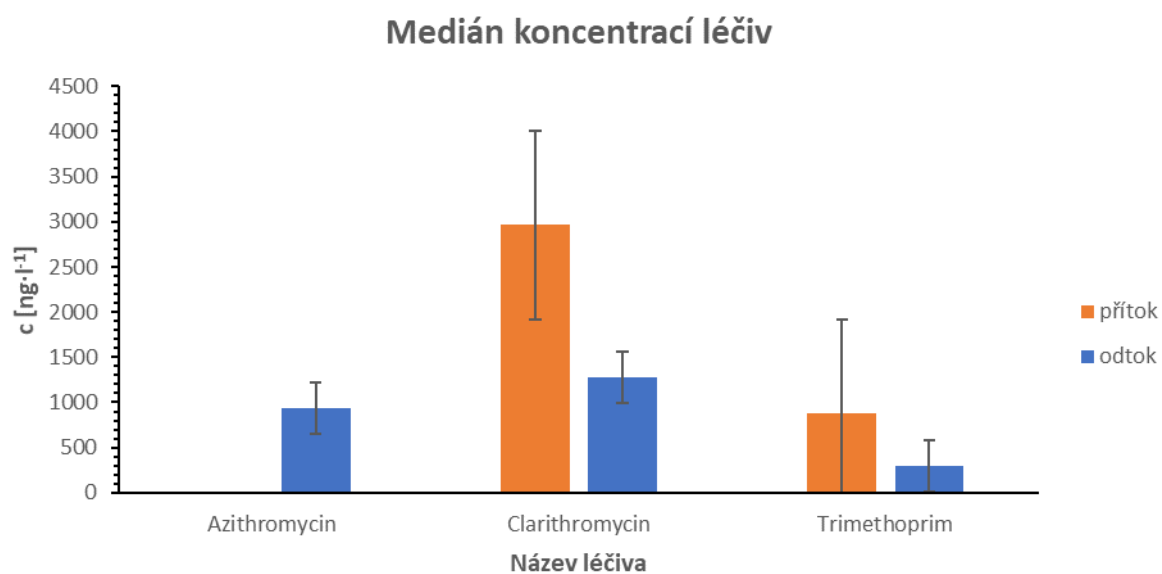


Obrázek č. 24 Koncentrace Clarithromycinu v jednotlivých dnech

Hodnoty koncentrací odtoku Azithromycinu dosahují poměrně vyrovnané úrovně napříč celým měřeným úsekem. V případě Clarithromycinu nedosahuje koncentrace přítoku, tj. až na dva dny 5 a 12. 4, extrémních odchylek vůči zbytku měření. Koncentrace Trimethoprimu na přítoku rovněž výrazněji vybočuje z průměru pouze u dvou dat, a to 1.4 a 2.4.



Obrázek č. 25 Průměrná koncentrace léčiv



Obrázek č. 26 Medián koncentrace léčiv

4.7 Účinnost odstranění léčiv z odpadní vody

Na základě konečných výsledků měření byla posouzena účinnost odstraňování všech tří léčiv v procesu čištění odpadní vody na ČOV – Modřice. Vždy byl vyhodnocen odtok z aktuálního dne a přítok z předchozího dne. Tato metodika byla použita z důvodu zkoumání právě posouzení účinnosti odstranění léčiv na ČOV. V případě vyhodnocování přítoku a odtoku z jednoho dne by to nebylo možné stanovit, protože proces čištění v ČOV trvá zpravidla 24 hodin. Z dvanáctidenního měření je proto pouze jedenáct vyhodnocení. Výsledky jsou prezentovány na obrázcích č. 15, 16 a v tab. 16 a tab. 17. Také nebylo možné posoudit účinnost odstranění u Azithromycinu, protože vzhledem k velkému matričnímu efektu nebylo možné separovat pomocí HPLC přítok u tohoto léčiva. Vyhodnocovaný program proto vyhodnotil nulové koncentrace Azithromycinu na všech vzorcích s přítokem, ačkoliv tam reálně byly. V případě Clarithromycinu je v jednom případě účinnost – 2,03 %. Tento údaj nemusí být pokládán okamžitě za chybný, přepadně přisouzen špatnému postupu měření. Příčinou můžou být i určité odchylky při měření. Po diskuzi s vedoucím práce byl tento údaj přisouzen možným rozkladným procesům, které se udály v průběhu 24 hodin od původního odběru na přítoku na ČOV. Jak bylo zmíněno v teoretické části této bakalářské práce, léčiva se mohou vylučovat nejen močí, ale rovněž stolicí. Právě léčivo obsažené ve stolici a rozložené až v ČOV mohlo negativně zkreslit účinnost odstranění léčiv.

Výpočet účinnosti odstranění léčiv z odpadní vody byl proveden v MS Excel.

$$\eta = 100 - Z \quad (\text{Rovnice č. 1})$$

$$\eta = 100 - [(C_1 / C_2) \cdot 100]$$

Význam jednotlivých symbolů:

Z ... zbytek v odtoku aktuálního dne ku přítoku předchozího dne

C₁ ... koncentrace odtoku aktuálního dne

C₂ ... koncentrace přítoku předchozího dne

Tabulka č. 9 Procentuální zbytek Clarithromycinu

Datum	Den	Procentuální zbytek Clarithromycinu o odtoku [%]
2. 4. 2019	Úterý	84,48
3. 4. 2019	Středa	28,73
4. 4. 2019	Čtvrtek	43,28
5. 4. 2019	Pátek	95,24
6. 4. 2019	Sobota	22,61
7. 4. 2019	Neděle	72,40
8. 4. 2019	Pondělí	53,94
9. 4. 2019	Úterý	60,12
10. 4. 2019	Středa	102,04
11. 4. 2019	Čtvrtek	43,56
12. 4. 2019	Pátek	93,54

Tabulka č. 10 Procentuální zbytek Trimethoprimu

Datum	Den	Procentuální zbytek Trimethoprimu v odtoku [%]
2. 4. 2019	Úterý	54,89
3. 4. 2019	Středa	16,36
4. 4. 2019	Čtvrtek	42,12
5. 4. 2019	Pátek	28,08
6. 4. 2019	Sobota	35,70
7. 4. 2019	Neděle	53,02
8. 4. 2019	Pondělí	44,48
9. 4. 2019	Úterý	26,88
10. 4. 2019	Středa	31,49
11. 4. 2019	Čtvrtek	20,29
12. 4. 2019	Pátek	25,34

Tabulka č.11 Účinnost odstranění Clarithromycinu

Datum	Den	Účinnost odstranění Clarithromycinu [%]
2. 4. 2019	Úterý	15,51
3. 4. 2019	Středa	71,27
4. 4. 2019	Čtvrtek	56,71
5. 4. 2019	Pátek	4,76
6. 4. 2019	Sobota	77,38
7. 4. 2019	Neděle	27,59
8. 4. 2019	Pondělí	46,05
9. 4. 2019	Úterý	39,87
10. 4. 2019	Středa	-2,03
11. 4. 2019	Čtvrtek	56,43
12. 4. 2019	Pátek	6,45

Tabulka č. 12 Účinnost odstranění Trimethoprimu

Datum	Den	Účinnost odstranění Trimethoprimu [%]
2. 4. 2019	Úterý	45,11
3. 4. 2019	Středa	83,64
4. 4. 2019	Čtvrtek	57,87
5. 4. 2019	Pátek	71,91
6. 4. 2019	Sobota	64,30
7. 4. 2019	Neděle	46,97
8. 4. 2019	Pondělí	55,52
9. 4. 2019	Úterý	73,12
10. 4. 2019	Středa	68,50
11. 4. 2019	Čtvrtek	79,70
12. 4. 2019	Pátek	74,65

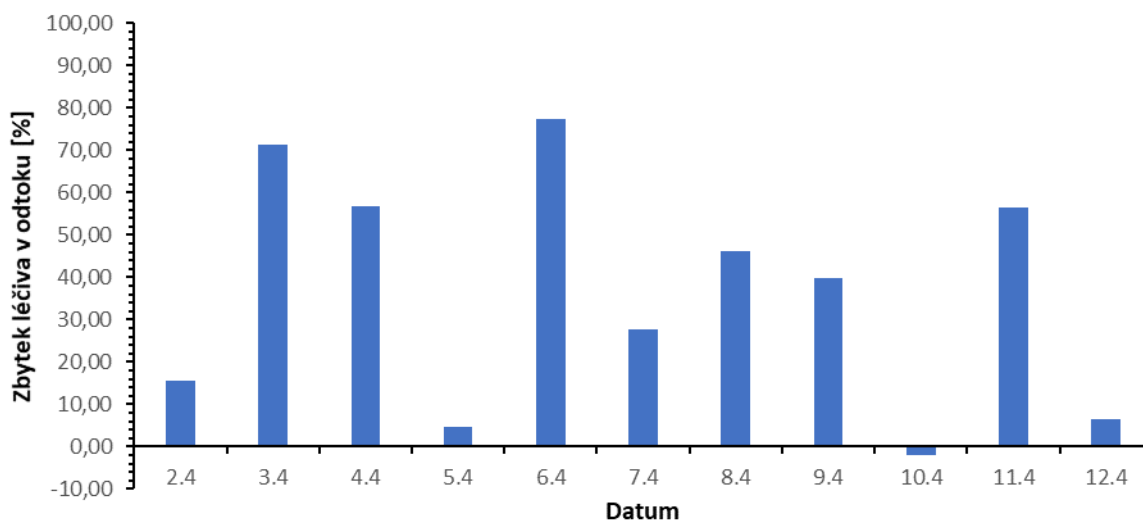
Pro výpočet průměru, mediánu a směrodatné odchylky byl využit MS Excel, konkrétně funkce PRŮMĚR pro průměr, funkce MEDIAN pro medián a funkci SMODCH pro směrodatnou odchylku. Zdrojem dat byly procentuální zbytky léčiv v jednotlivých dnech.

Tabulka č. 13 Souhrnné údaje procentuálního účinnosti čištění

	Clarithromycin	Trimethoprim
Průměr [%]	36,36	65,57
Medián [%]	39,87	68,50
Relativní směrodatná odchylka [%]	26,46	12,21

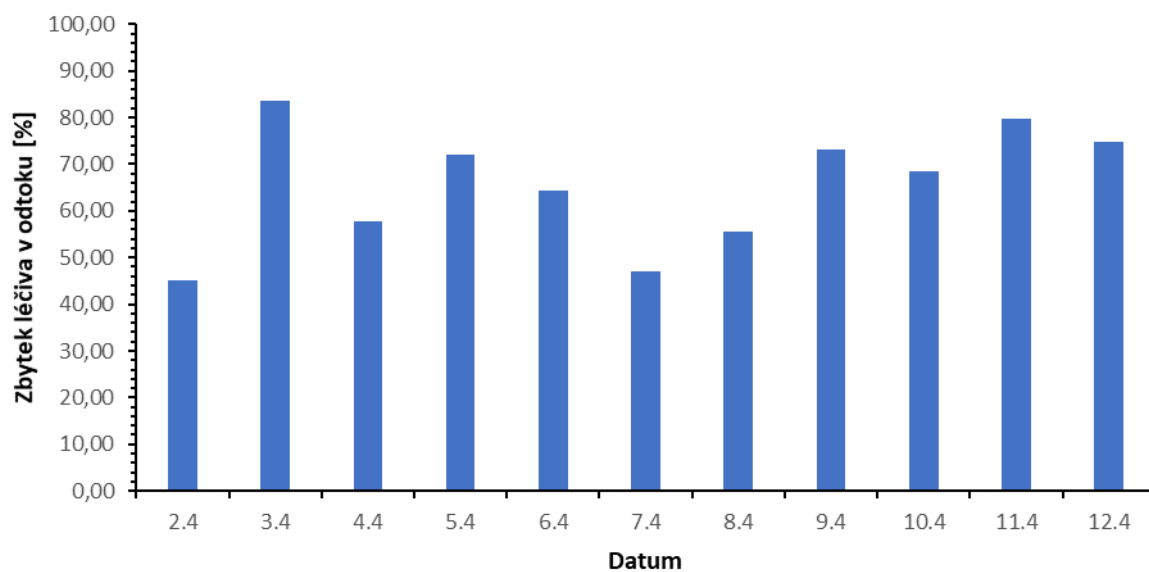
Z tabulek č. 11 a 12 je zřejmé, že průměrná účinnost odstranění Clarithromycinu dosahuje 36,36 %, zatímco v případě Trimethoprimu je to 65,57 %. Z dostupných dat lze proto odvodit, že odstraňování Trimethoprimu je při stejných podmínkách účinnější než v případě Clarithromycinu. Na podkladě toho lze vyslovit závěr, že biologické čištění je v případě Trimethoprimu účinnější.

Účinnost odstranění Clarithromycinu v odtoku



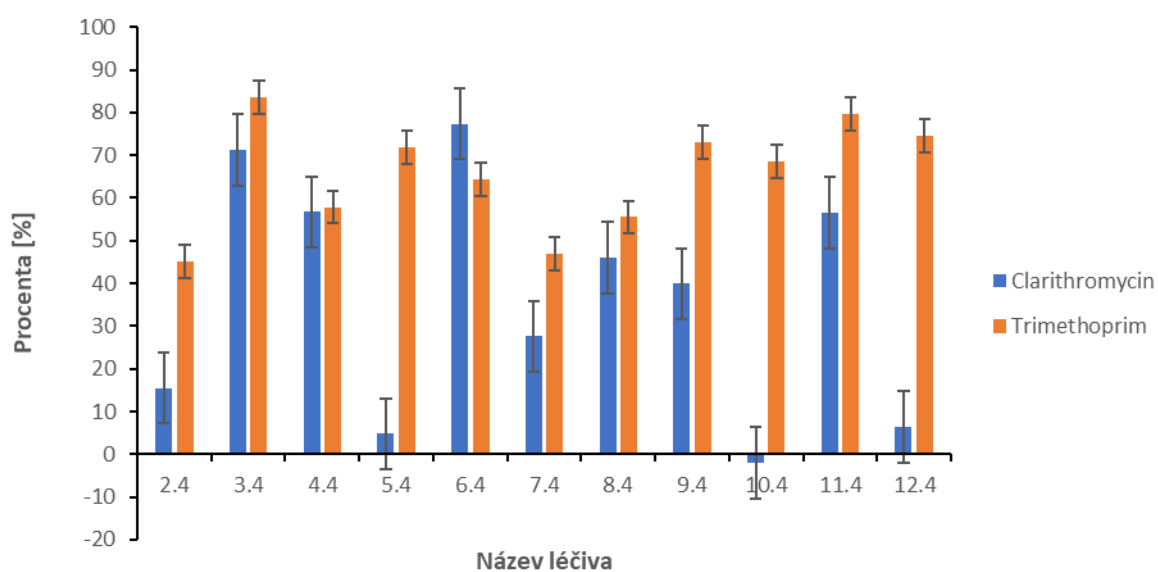
Obrázek č. 27 Účinnost odstranění Clarithromycinu v odtoku

Účinnost odstranění Trimethoprimu v odtoku

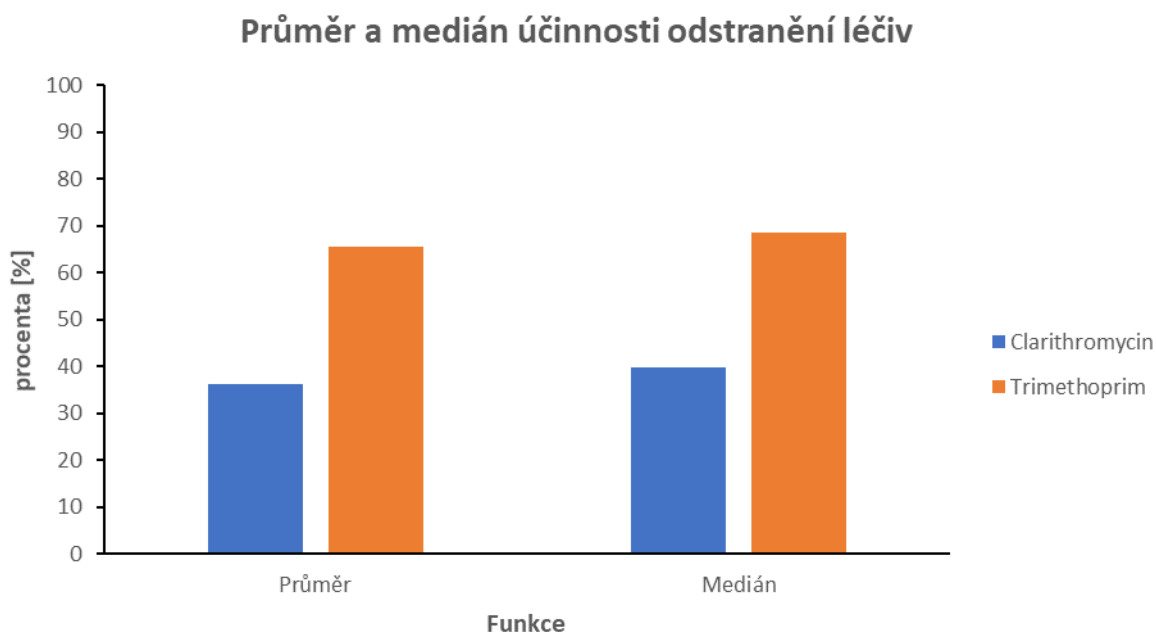


Obrázek č. 28 Účinnost odstranění Trimethoprimu v odtoku

Porovnání účinnosti odstranění léčiv



Obrázek č. 29 Porovnání účinnosti odstranění léčiv



Obrázek č. 30 Průměr a medián účinnosti odstranění léčiv

4.8 Porovnání se zahraničními údaji

Výsledky účinnosti odstranění léčiv ČOV byly porovnány se studiemi zabývající se obdobnou problematikou ve světě. Výsledky pro Azithromycin nebyly brány v úvahu, protože nebylo možné stanovit účinnost bez hodnot koncentrací na přítoku. Pro porovnání byly převzata data ze studií pocházejících ze Švédska a Japonska. V případě Švédska zkoumali vědci účinnost odstraňování léčiv u pěti švédských měst. Vědecká studie probíhala v letech 2002–2003 a byla zveřejněna byla v roce 2005. Z výsledků byl převzat údaj pro Trimethoprim z roku 2002 na ČOV pro město Gothenburg, protože se svojí velikostí populace nejvíce přiblížil Brnu. Měření probíhalo stejně, jako v případě zpracování této bakalářské práce, na přístrojích HPLC/ MS [58]. Japonští vědci porovnávali procesy odstraňování léčiv na ČOV s pokročilou technologií píseční filtrace a odstraňování léčiv ozonem. Měření probíhalo v hlavním městě Tokiu. Z jejich výzkumu byly pro porovnání převzaty údaje pro Clarithromycin a Trimethoprim. Výzkum probíhal v roce 2005, studie byla zveřejněna v roce 2007. Vyhodnocování zde probíhalo na přístrojích GS/MS [59].

Tabulka č. 14 Informace o ČOV

ČOV	Pro počet obyvatel	Ústí odtoku
Brno	477 000	Řeka Svratka
Tokio	460 000	Filipínské moře
Gothenburg	605 000	Severní moře

Tabulka č. 15 Koncentrace léčiv v ČOV

Město	Průměrná koncentrace Clarithromycinu na přítoku [ng·l ⁻¹]	Průměrná koncentrace Clarithromycinu na odtoku [ng·l ⁻¹]	Průměrná koncentrace Trimethoprimu na přítoku [ng·l ⁻¹]	Průměrná koncentrace Trimethoprimu na odtoku [ng·l ⁻¹]
Brno	2962,20	1271,38	884,19	376,08
Japonsko	228,00	20,90	53,50	0,22
Švédsko	–	–	208,00	66,00

Tabulka č.16 Průměrná účinnost odstraňování léčiv

Město	Průměrná účinnost odstranění Clarithromycinu [%]	Průměrná účinnost odstranění Trimethoprimu [%]
Brno	36,3	65,5
Japonsko	84,6	96,0
Švédsko	–	68,0

Ze získaných dat lze odvodit, že nejúčinněji probíhalo odstraňování v Japonsku. Jejich ČOV využívala i technologii odstraňování léčiv ozonem, která se projevila jako velice efektivní pro odstranění obou sledovaných léčiv. Porovnání České republiky (Brno) a Švédska (Gothenburg) indikuje v případě Trimethoprimu obdobné výsledky při odstraňování zmíněného léčiva z odpadních vod.

5 Závěr

Předmětem této bakalářské práce bylo stanovit vybraná léčiva v odpadních vodách, konkrétně trimethoprim, azithromycin a clarithromycin. Tato tři farmaka byla vybrána z důvodu jejich častého využívání v moderní medicíně. Bylo nutné nalézt nejvhodnější možný způsob pro jejich stanovení. Po konzultaci s konzultantkou Ing. Landovou a školitelkou Prof. Vávrovou bylo rozhodnuto o využití metody extrakce tuhou fází pro izolaci analytů a následným měřením koncentrací pomocí systému HPLC/MS. Tento systém se výborně osvědčil pro tento typ posuzování kontaminace odpadních vod. Po samotné optimalizaci metody naznačovaly již výsledky pilotní studie z uměle připravených vzorků výbornou odezvu.

Vzhledem k dosavadním zkušenostem byla zvolena v případě odpadních vod jako optimální metoda pro izolaci analytu z matrice extrakce tuhou fází (SPE). Jako vhodné extrakční kolonky se osvědčily kolonky Oasis® HLB (60 mg), které svojí kapacitou plně vyhovovaly analyzovaným objemům.

Vlastní separace analytu probíhala na koloně KINETEX C18 s rozměry 2.1 x 150 mm a velikosti částic 2.6 μm . Součástí optimalizace chromatografických podmínek byl výběr mobilní fáze, která měla složení acetonitril a roztok 0,01 M kyseliny mravenčí v MQ vodě. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,22 ml/minutu, nástřik byl stanoven na 2 μl a teplota kolony na 40 °C. Hmotnostní spektrometr byl optimalizován na tlak 25 psi v případě zmlžovače, průtok sušícího plynu na 10 l/min a sušící teploty na 350 °C.

V průběhu 12 dní byly odebírány vzorky odpadní vody z ČOV Brno-Modřice. Vždy se jednalo o vzorky na přítoku a na odtok z téhož dne. Tyto reálné vzorky byly následně použity pro stanovení léčiv. Ve dvou případech ze tří se podařilo úspěšně stanovit koncentraci daného farmaka jak na přítoku, tak také na odtoku. V případě Azithromycinu byla po odborné konzultaci přisouzena nulová koncentrace na přítoku vlivu silného matričního efektu. Výsledné hodnoty koncentrací se pohybovaly v jednotkách ng/l^{-1} . V případě Trimethoprimu byla prokázána vyšší schopnost ČOV odstraňovat zbytky léčiva na odtoku, konkrétně až s 66% úspěšností. V případě Clarithromycinu dosahoval proces odbourávání pouhých 36 %. Důvodem může být použité biologické čištění.

Při porovnání s výsledky dalších studií ze světa se ukázalo, že nejvyšší účinnost dosahují technologie za použití čištění ozonem. Nicméně tato technologie je v případě České republiky ve většině případů stále finančně nedostupná. Autor je však nicméně přesvědčen, že v následujících letech dojde k většímu rozšíření této technologie i na území České republiky.

Autor této práce považuje za hlavní přínos této práce upozornit na rizika spojená se zbytečným nadužíváním antibiotik a jejich následnému problematickému odstraňování ze složek životního prostředí. S touto problematikou úspěšně seznamoval svoje blízké okolí a snažil se vyvolávat diskuzi i mezi svými kolegy na chemické fakultě VUT.

6 Reference

- [1] STÁTNÍ ÚSTAV PRO KONTROLU LÉČIV. *Podmínky pro výkon distribuční činnosti na území ČR, Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. 2019 [vid. 2019-04-07]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/leciva/podminky-pro-vykon-distribucni-cinnosti-na-uzemi-cr-1>
- [2] SOUVISEJÍCÍCH, Česká republika. Zákon o léčivech: o léčivech a o změnách některých a ZÁKONŮ. 378/2007 Sb. [online]. 2007 [vid. 2019-04-07]. Dostupné z: <http://www.psp.cz/sqw/sbirka.sqw?r=2007&cz=378>
- [3] VITVAROVÁ, Alena. *Stanovení léčiv v odpadních vodách* [online]. B.m., 2013 [vid. 2019-04-17]. b.n. Dostupné z: <https://is.muni.cz/th/boptz/>
- [4] FRANTIŠEK, Hampl, Rádl STANISLAV a Paleček JAROSLAV. *Farmakochemie*. B.m.: VŠCHT Praha (2. vydání, 2007), 2007. ISBN 978-80-7080-639-5.
- [5] HÁJEK, Radek. *Stanovení léčiv v kalech z čistíren odpadních vod* [online]. B.m., 2013 [vid. 2019-04-17]. Vysoké učení technické v Brně. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/58574>
- [6] MULLIN RICK. Cost to Develop New Pharmaceutical Drug Now Exceeds \$2.5B - Scientific American. *Scientific American* [online]. 2014 [vid. 2019-04-07]. Dostupné z: <https://www.scientificamerican.com/article/cost-to-develop-new-pharmaceutical-drug-now-exceeds-2-5b/>
- [7] MAYEY, Otto. *Originální lék versus generikum* [online]. 2012 [vid. 2019-04-07]. Dostupné z: www.internimedicina.cz
- [8] LÜLLMANN, Heinz, Klaus MOHR a Martin WEHLING. *Farmakologie a toxikologie*. 15. vyd. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247- 0836-1.
- [9] LINCOVÁ, Dagmar a Hassan FARGHALI. *Základní a aplikovaná farmakologie*. B.m.: Galén, 2002. ISBN 8072621688.
- [10] HANSLIANOVÁ, Markéta. Antibiotika včera, dnes a zítra - Fakultní nemocnice Brno. *Fakultní nemocnice Brno* [online]. 2019 [vid. 2019-04-07]. Dostupné z: <https://www.fnbrno.cz/antibiotika-vcera-dnes-a-zitra/t5753>
- [11] BREED, R S a H J CONN. The Status of the Generic Term Bacterium Ehrenberg 1828. *Journal of bacteriology* [online]. 1936, **31**(5), 517–8 [vid. 2019-04-07]. ISSN 0021-9193. Dostupné

z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16559906>

- [12] DEMAİN, Arnold L a Sergio SANCHEZ. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics* [online]. 2009, **62**, 5–16 [vid. 2019-04-07]. Dostupné z: [doi:10.1038/ja.2008.16](https://doi.org/10.1038/ja.2008.16)
- [13] GAYNES, Robert. The Discovery of Penicillin—New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use. *Emerging Infectious Diseases* [online]. 2017, **23**(5), 849–853 [vid. 2019-04-07]. ISSN 1080-6040. Dostupné z: [doi:10.3201/eid2305.161556](https://doi.org/10.3201/eid2305.161556)
- [14] SINGH, Rochika, Lakshmi SRIPADA a Rajesh SINGH. Side effects of antibiotics during bacterial infection: Mitochondria, the main target in host cell. *Mitochondrion* [online]. 2014, **16**, 50–54 [vid. 2019-04-09]. ISSN 1567-7249. Dostupné z: [doi:10.1016/J.MITO.2013.10.005](https://doi.org/10.1016/J.MITO.2013.10.005)
- [15] NGUYEN, Timothy. Penicillin Allergy: A Revisit for Nurse Practitioners. *The Journal for Nurse Practitioners* [online]. 2018, **14**(3), 211–212 [vid. 2019-04-09]. ISSN 1555-4155. Dostupné z: [doi:10.1016/J.NURPRA.2017.12.015](https://doi.org/10.1016/J.NURPRA.2017.12.015)
- [16] SCHWARTZ, Kevin L. a Shaun K. MORRIS. Travel and the Spread of Drug-Resistant Bacteria. *Current Infectious Disease Reports* [online]. 2018, **20**(9), 29 [vid. 2019-04-09]. ISSN 1523-3847. Dostupné z: [doi:10.1007/s11908-018-0634-9](https://doi.org/10.1007/s11908-018-0634-9)
- [17] LOCHMANN, Otto. *Antimikrobní terapie v praxi*. 1. vyd. Praha: Triton, 2006. ISBN 80-7254-826-3.
- [18] CONSUMERS, HEALTH, Agriculture and Food Executive Agency. *Antimikrobiální rezistence (AMR) cesta k uvážlivějšímu používání antimikrobiálních látek a antibiotik*. [online]. Luxembourg: Luxembourg: Publications Office, 2018. ISBN 9789292008161. Dostupné z: [doi:10.2818/74582](https://doi.org/10.2818/74582)
- [19] URBÁŠKOVÁ, P., V. MAREŠOVÁ, V. JINDRÁK, O. NYČ, J. SUCHOPÁR, T. SECHSER, J. HOZA, I. KAREN a J. ŠVIHOVEC. *Konsensus používání antibiotik II. Makrolidová antibiotika* [online]. B.m., 2019 [vid. 2019-04-12]. b.n. Dostupné z: www.cls.cz
- [20] BACANLI, Merve a Nurşen BAŞARAN. Importance of antibiotic residues in animal food. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2019, **125**, 462–466 [vid. 2019-04-09]. ISSN 0278-6915. Dostupné z: [doi:10.1016/J.FCT.2019.01.033](https://doi.org/10.1016/J.FCT.2019.01.033)
- [21] JINDRÁK, Vlastimil. *Antibiotika - obecná část* [online]. 2004. Dostupné z: <https://mefanet-motol.cuni.cz/download.php?fid=16%0A>

- [22] LEVISON, Matthew E a Julie H LEVISON. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Antibacterial Agents [online]. 2009 [vid. 2019-04-10]. Dostupné z: doi:10.1016/j.idc.2009.06.008
- [23] SZULTKA-MLYNSKA, Malgorzata a Boguslaw BUSZEWSKI. Study of in-vitro metabolism of selected antibiotic drugs in human liver microsomes by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2016, **408**(29), 8273–8287 [vid. 2019-04-10]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-016-9929-6
- [24] TEPLÁ, Milada. *Buňka - Transport látek přes membrány* [online]. [vid. 2019-04-10]. Dostupné z: <http://www.studiumbiochemie.cz/bunka4.html>
- [25] JANKŮ, Ivo. *Eliminace léčiv*. 1. Praha: Avicenum, 1986.
- [26] LE, Jennifer. Drug Metabolism - Drugs - Merck Manuals Consumer Version. *Merck Manual* [online]. 2018 [vid. 2019-04-10]. Dostupné z: <https://www.merckmanuals.com/home/drugs/administration-and-kinetics-of-drugs/drug-metabolism>
- [27] PANDYA, Malay. Drug metabolism. *Drug metabolism* [online]. 2018 [vid. 2019-04-10]. Dostupné z: <https://www.slideshare.net/MalayPandya1/drug-metabolism-111690745>
- [28] SEIFRTOVÁ, Marcela, Lucie NOVÁKOVÁ, Celeste LINO, Angelina PENA a Petr SOLICH. An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2009, **649**(2), 158–179 [vid. 2019-04-10]. ISSN 0003-2670. Dostupné z: doi:10.1016/J.ACA.2009.07.031
- [29] DWIVEDI, Sanjay, Seema MISHRA a Rudra Deo TRIPATHI. Ganga water pollution: A potential health threat to inhabitants of Ganga basin. *Environment International* [online]. 2018, **117**, 327–338 [vid. 2019-04-10]. ISSN 0160-4120. Dostupné z: doi:10.1016/J.ENVINT.2018.05.015
- [30] MANYI-LOH, Christy, Sampson MAMPHWELI, Edson MEYER a Anthony OKOH. Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications. *Molecules (Basel, Switzerland)* [online]. 2018, **23**(4) [vid. 2019-04-10]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules23040795
- [31] AVENDAÑO-HERRERA, Ruben. Proper antibiotics use in the Chilean salmon industry: Policy and technology bottlenecks. *Aquaculture* [online]. 2018, **495**, 803–805 [vid. 2019-04-10]. ISSN 0044-8486. Dostupné z: doi:10.1016/J.AQUACULTURE.2018.06.072

- [32] CHANGOTRA, Rahil, Himadri RAJPUT a Amit DHIR. Treatment of real pharmaceutical wastewater using combined approach of Fenton applications and aerobic biological treatment. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* [online]. 2019, **376**, 175–184 [vid. 2019-04-10]. ISSN 1010-6030. Dostupné z: doi:10.1016/J.JPHOTOCHEM.2019.02.029
- [33] JELIC, Aleksandra, Meritxell GROS, Antoni GINEBREDÀ, Raquel CESPEDÉS-SÁNCHEZ, Francesc VENTURA, Mira PETROVIC a Damia BARCELO. Occurrence, partition and removal of pharmaceuticals in sewage water and sludge during wastewater treatment. *Water Research* [online]. 2011, **45**(3), 1165–1176 [vid. 2019-04-11]. ISSN 0043-1354. Dostupné z: doi:10.1016/J.WATRES.2010.11.010
- [34] MICHAEL, I., L. RIZZO, C.S. MCARDELL, C.M. MANAIA, C. MERLIN, T. SCHWARTZ, C. DAGOT a D. FATTA-KASSINOS. Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: A review. *Water Research* [online]. 2013, **47**(3), 957–995 [vid. 2019-04-11]. ISSN 0043-1354. Dostupné z: doi:10.1016/J.WATRES.2012.11.027
- [35] DOHÁNYOS, Michal, Jan KOLLER a Nina STRNADOVÁ. *Čištění odpadních vod*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2007. ISBN 9788070806197.
- [36] LANDOVÁ, Pavlína. *Problematika výskytu penicilinových antibiotik ve vodách* [online]. B.m., 2014 [vid. 2019-04-17]. Vysoké učení technické v Brně. Dostupné z: https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/67411?zp_id=67411
- [37] ŠMÍDOVÁ, Jiřina. Odpadní vody ze Dvora Králové stále vytékají do Labe | iROZHLAS - spolehlivé zprávy. *iRozhlas* [online]. 2012 [vid. 2019-04-11]. Dostupné z: https://www.irozhlas.cz/regiony/odpadni-vody-ze-dvora-kralove-stale-vytekaji-do-labe_201202080815_epres
- [38] VELKÝ LÉKAŘSKÝ SLOVNÍK. *Chemoterapeutika* [online]. 2019 [vid. 2019-04-12]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/pojem/chemoterapeutika>
- [39] NIST, National Institute of Standards and Technology. *Trimethoprim* [online]. 2019 [vid. 2019-04-12]. Dostupné z: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C738705&Mask=200&Units=SI>
- [40] STÁTNÍ ÚSTAV PRO KONTROLU LÉČIV. *TRIMETHOPRIM TABLETS BP, 200MG TBL NOB 14, Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. [vid. 2019-04-12]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0232060&tab=texts>
- [41] MEDIMATELY. *TRIMETHOPRIM TABLETS BP 200MG Tableta — Databáze léčiv* [online].

- 2019 [vid. 2019-04-12]. Dostupné z: <https://medately.co/cz/drugs/PpdeJiZ0tY16dJv44S1PxUZUNT5/trimethoprim-tablets-bp-200mg-tableta#indications>
- [42] HAVLÍK, Jiří. Makrolidová antibiotika a jejich využití v ambulantní praxi. *Medicina pro praxi* [online]. 2010, 356–367 [vid. 2019-04-12]. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2010/08/04.pdf>
- [43] GREENWOOD, David. *Antimicrobial drugs : chronicle of a twentieth century medical triumph* [online]. B.m.: Oxford University Press, 2008 [vid. 2019-04-13]. ISBN 9780199534845. Dostupné z: <https://global.oup.com/academic/product/antimicrobial-drugs-9780199534845?cc=cz&lang=en&>
- [44] U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. *Azithromycin* [online]. 2019. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/447043#section=2D-Structure>
- [45] WIKISKRIPTA. *Azalidy* [online]. 2019. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Azalidy>
- [46] ROZSYPAL, Hanuš. Základy infekčního lékařství. In: *Základy infekčního lékařství*. Charles Un. Praha: Karolinum Press, 2015, s. 572. ISBN 8024629321.
- [47] NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. *PubChem Database Clarithromycin* [online]. 2019. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/84029>
- [48] DRUGBANK. *Clarithromycin* [online]. 2019. Dostupné z: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01211>
- [49] U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. *Method 1694: Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS* [online]. 2007 [vid. 2019-04-13]. Dostupné z: <http://www.epa.gov/waterscience>
- [50] MACKULAK, Tomáš, Paula BRANDEBUROVÁ, Anna GRENČÍKOVÁ, Igor BODÍK, Andrea Vojs STAŇOVÁ, Oksana GOLOVKO, Olga KOBÁ, Markéta MACKULAKOVÁ, Viera ŠPALKOVÁ, Miroslav GÁL a Roman GRABIC. Music festivals and drugs: Wastewater analysis. *Science of The Total Environment* [online]. 2019, **659**, 326–334 [vid. 2019-04-13]. Dostupné z: [doi:10.1016/J.SCITOTENV.2018.12.275](https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.12.275)
- [51] FONTANALS, Núria, Eva POCURULL, Francesc BORRULL a Rosa Maria MARCÉ. Role of the solid-phase extraction in wastewater-based epidemiology. *Current Opinion in Environmental Science & Health* [online]. 2019 [vid. 2019-04-13]. ISSN 2468-5844. Dostupné

z: doi:10.1016/J.COESH.2019.03.006

- [52] MAREŠOVÁ, Věra. *Principy řízených extrakcí nox z biologického materiálu pro různé typy toxikologických analýz* [online]. B.m., nedatováno. 1 LF UK. Dostupné z: <https://docplayer.cz/36217146-Principy-rizenych-extrakci-nox-z-biologickeho-materialu-pro-ruzne-typy-toxikologickych-analyz-vyznam-spravne-pripravy-vzorku-pro-konecny-vysledek.html>
- [53] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi* [online]. B.m.: Lucie Nováková, 2013 [vid. 2019-04-13]. ISBN 9788026042440. Dostupné z: https://primo.lib.vutbr.cz/primo-explore/fulldisplay?vid=420BUT&search_scope=Everything&tab=default_tab&docid=420BUT_Aleph000119703&lang=cs_CZ&context=L&adaptor=LocalSearchEngine&sortby=rank&mode=advanced&offset=0
- [54] NIETO, Antonio, Francesc BORRULL, Rosa Maria MARCÉ a Eva POCURULL. Selective extraction of sulfonamides, macrolides and other pharmaceuticals from sewage sludge by pressurized liquid extraction. *Journal of Chromatography A* [online]. 2007, **1174**(1–2), 125–131 [vid. 2019-04-18]. Dostupné z: doi:10.1016/J.CHROMA.2007.09.068
- [55] CVAČKA, Josef. *Vysokoučinná kapalinová chromatografie Instrumentace Schéma přístroje pro HPLC* [online]. 2018 [vid. 2019-04-13]. Dostupné z: http://www.muji-web.cz/vyuka/HPLC/HPLC_soubory/03_HPLC_instrumentace.pdf
- [56] HÁKOVÁ, Eva. *ULTRA PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (UPLC) ULTRA-HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (UHPC) Pokroky v moderních separačních metodách*, 2012 [online]. 2012 [vid. 2019-04-18]. Dostupné z: <https://www.natur.cuni.cz/chemie/analchem/cabala/ke-stazeni/pokroky-v-modernich-separacnich-metodach/ultra-performance-liquid-chromatography-uplc/>
- [57] VÁVROVÁ, Jaroslava. *Chromatografie* [online]. 2019 [vid. 2019-04-18]. Dostupné z: http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/AJALB.htm
- [58] RICHARD H. LINDBERG, *, PATRIK WENNBERG, MAGNUS I. JOHANSSON, and MATS TYSKLIND a Barbro A. V. ANDERSSON. Screening of Human Antibiotic Substances and Determination of Weekly Mass Flows in Five Sewage Treatment Plants in Sweden [online]. 2005 [vid. 2019-05-16]. Dostupné z: doi:10.1021/ES048143Z
- [59] NAKADA, Norihide, Hiroyuki SHINOHARA, Ayako MURATA, Kentaro KIRI, Satoshi MANAGAKI, Nobuyuki SATO a Hideshige TAKADA. Removal of selected pharmaceuticals

and personal care products (PPCPs) and endocrine-disrupting chemicals (EDCs) during sand filtration and ozonation at a municipal sewage treatment plant. *Water Research* [online]. 2007, **41**(19), 4373–4382 [vid. 2019-05-16]. ISSN 0043-1354. Dostupné z: doi:10.1016/J.WATRES.2007.06.038

7 Seznam použitých zkratek a symbolů

ČOV	Čistírna odpadních vod
DAD	Detektor s diodovým polem
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EPA	Environmental Protection Agency
GIT	Gastrointestinální trakt
GS	Plynová chromatografie
HCOOH	Kyselina mravenčí
HPLC	Vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii
K _D	Kalová sorpční konstanta
LLE	Extrakce kapalina/kapalina
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
MS	Hmotnostní spektrometrie
tRNA	Transportní ribonukleová kyselina
UHPLC	Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV-VIS	Spektrofotometrický detektor